©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Über die Resistenz verschiedener Algen gegen Vitalfarbstoffe

Von Walter Loub

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 4 Textabbildungen

(Vorgelegt in der Sitzung am 11. Oktober 1951)

Einleitung.

In den letzten Jahrzehnten hat die Erforschung des lebenden pflanzlichen Protoplasmas einen großen Aufschwung erlebt. So kam es zur Begründung der „Protoplasmatischen Anatomie" durch Weber (1929) und der „Vergleichenden Protoplasmatik" durch Höfler (1932, 1934). Auf zwei Teilgebieten, dem Studium der spezifischen Permeabilitätseigenschaften und der vergleichenden Resistenzforschung, begann bald eine erfolgversprechende Entwicklung. Über Resistenz liegen bereits zahlreiche Untersuchungen vor. Vor allem hat Küster sich der Beobachtung und Beschreibung des Nekroseverlaufs und der Nekrosebilder gewidmet. Lepeschkin hat seine Beobachtungen auf diesem Gebiet in dem Buch „Zellnekrobiose und Protoplasmatod" (1937) zusammengefaßt. 1933 und 1938 folgten Arbeiten von Iljin, Biebl und Kylin, die sich vorwiegend auf das Gebiet der ökologischen und umweltbezogenen Resistenz erstreckten. Seit 1937 lieferten Höfler, Schindler, Hofmeister, Ganzinger und Eiselsberg Beiträge zur morphologischen Kennzeichnung der Giftwirkung einzelner ausgewählter Substanzen auf bestimmte Zellobjekte. Im Zuge protoplasmatisch anatomischer Untersuchungen von Weber und seinen Schülern wurde schon vorher die Giftwirkung auf morphologisch gleiche Zellen desselben Gewebes zur physiologischen Kennzeichnung solcher Zellen und Zellsorten angewendet (Moder 1932, Weber 1932, Meindl 1934).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Während Brenner (1918), Biebl und Eiselsberg darangingen, die Resistenzeigenschaften verschiedener Plasmasorten und Pflanzen statistisch, durch Resistenztabellen und Absterbekurven, zu erfassen, beschrieben Höfler, Küster, Schindler, Lepeschkin und Ganzinger mehr den Nekrosevorgang an der Einzelzelle.

Was die vergleichende Untersuchung an Algen betrifft, liegen zahlreiche französische Arbeiten über das Verhalten bei Vitalfärbung vor. Chadefaud hat vor allem Tribonema (1935) und andere Heterokonten, Dangeard verschiedene Grünalgen und auch Euglenen (1947) untersucht. Guilliermond (1933, 1941) hat an verschiedenen Objekten, auch an Pilzen, die Giftwirkung verschiedener organischer Farbstoffe beobachtet. 1937 beschrieb Cholnoky Entmischungserscheinungen, die durch Vitalfarbstoffe im Plasma hervorgerufen wurden. Erst in letzter Zeit haben Cholnoky und Höfler (1945—1951) den Verlauf von Vitalfärbungen an verschiedenen Süßwasseralgen untersucht.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sollen vergleichende Untersuchungen über die Resistenz verschiedener Süßwasseralgen gegen saure und basische Vitalfarbstoffe sein. Ganz besonders soll dabei beachtet werden, ob sich bestimmte systematische oder ökologische Gruppen durch besondere Resistenzeigentümlichkeiten hervorheben oder zusammenfassen lassen.

Material und Methodik.

Das für die Versuche verwendete Material stammte von ökologisch und geographisch ganz verschiedenen Standorten. So wurden zahlreiche Proben in der Umgebung von Lunz gesammelt, und zwar in den stark sauren Schlenken des Rotmooses (Hochmoor), aus der Tintenlacke (Blänke im Rotmoos), auf den beiden Schwingrasenmooren des Obersees (Schlenken, Schwingrasenlöcher und seeseitiger Rasenrand), in zahlreichen Almtümpeln (vorwiegend kalkreiche, oft eutrophe Kleingewässer), im kleinen Kammoor des Rehbergs, in den Schlenken eines Hochmoors bei Göstling und aus dem Litoral des Lunzer Untersees. Unter den Proben vom Oberseeschwingrasen waren einige sehr artenreich (teils typische Zwischenmoorgesellschaften), während andere fast die gleiche Zusammensetzung aufwiesen wie das ziemlich artenarme Material aus den stark sauren Rotmoosschlenken.

Viele Proben wurden auch aus den Wässern von Flachmooren und anmoorigen Stellen bei Mariazell, vom Erlaufsee und vom Hechtenseemoor eingebracht. Das im Schwingrasenmoor des

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Hechtensees gesammelte Material zeigte alle Ausbildungen und Übergänge von Hoch- und Zwischenmoorgesellschaften, vor allem aber eine große Ähnlichkeit mit der Mikroflora des Oberseeschwingrasens. Zahlreiche Aufsammlungen wurden auch in den Mooren und Gewässern anmooriger Stellen in der Umgebung der Ramsau bei Schladming durchgeführt[1]. Dieses Material war, soweit es nicht aus extremen Hochmoorschlenken stammte, das artenreichste unter allen bisher eingebrachten.

Bei einer mehrtägigen Exkursion, die über Aussee, Ödensee, Pichl, Kainisch, Knoppen, Mitterndorf, Wörschach und Selztal nach Windischgarsten und Teichl führte, wurden in den in der Umgebung der genannten Orte liegenden Mooren viele Proben gesammelt und ein Teil davon schon nach dem zweiten Exkursionstag von einem Exkursionsteilnehmer direkt nach Wien gebracht.

Durch Aufsammlungen aus Hochmooren, Teichverlandungen und moosverwachsenen Abzugsgräben feuchter Wiesen bei Karlstift[2], wurde mein Versuchsmaterial weiter bereichert.

Einige Versuche wurden auch mit den von mir in den Hochmooren der Gerlosplatte und des Trattenbachtals gesammelten Algen durchgeführt.

Ein Teil der Versuchsobjekte stammte auch aus der näheren Umgebung Wiens, aus Moosbrunn, Laxenburg, Schwechat, Großenzersdorf und der Lobau, und zwar aus Altwässern, Ziegelteichen, kleinen ephemeren Tümpeln und Wassergräben.

Das eingebrachte Material wurde im Institut zum Teil in kühlen Nordfenstern, zum Teil im hellen, kalten Fließwasserbecken des Institutsglashauses untergebracht und später von mir durchgesehen und bestimmt.

Es waren also Algen von verschiedenen ökologischen Standorten vorhanden. Aerophyten und Algen aus schnellfließenden Wässern konnten nicht in die Versuchsreihen einbezogen werden. Es fanden auch nur solche Algen in die Arbeit Aufnahme, deren Artzugehörigkeit einwandfrei feststellbar war. Vor und während der Versuche wurde das Material ständig kontrolliert, da nur solche Proben in den Resistenzreihen verwendet wurden, deren Zusammensetzung sich seit der Aufsammlung nicht wesentlich verändert hatte und deren Individuen keine pathologischen Veränderungen zeigten.

Die Verdünnungen der Substanzen der Versuchsreihen sind in Gewichtsprozenten angegeben. Die Stoffe wurden vor jedem Versuch frisch in Aqua bidest. gelöst. Die Algen wurden zu den in

[1] Leg. Prof. Dr. K. Höfler, Doz. Dr. H. Schindler und Dr. I. Krebs.

[2] N.-Ö. Leg. Frl. cand. phil. Tollerian.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

kleine Gläschen abgefüllten Lösungen, unter Miteinbeziehung ihres Volumens in die entsprechende Verdünnung, zugegeben. Die Flüssigkeitsmenge einschließlich der Algen betrug 10—15 cm^3. Eine mögliche Speicherkonkurrenz durch etwa vorhandene Detritusteilchen wurde durch oftmals wiederholtes Durchmischen während des Versuches weitgehend ausgeschaltet. Schädliche Lichteinwirkung ließ sich dadurch vermeiden, daß die Versuchsgläschen ungefähr einen halben Meter vom Nordfenster entfernt aufgestellt wurden oder bei lichtempfindlichen Färbungen, wie z. B. Erythrosin oder Eosin, mit matt durchscheinendem Papier abgedeckt wurden. Viele Farblösungen waren durch Phosphatpuffer auf bestimmte p_H-Werte gebracht. Um zu prüfen, ob etwa die $H^{\cdot}$-ionenkonzentrationen als solche schädlich wirkten, wurden parallel Kontrollversuche in entsprechenden Pufferlösungen, aber ohne Farbstoffzusatz, aufgestellt. Als Kennzeichen für die Giftwirkung der Stoffe auf die einzelne Zelle wurde deren Aussehen, Plasmaströmung, Färbe- und Plasmolyseverhalten verwertet. Als Plasmolytika verwendete ich 0,3—0,4 mol $CaCl_2$ und 0,6—0,1 mol Traubenzuckerlösungen. Die Ergebnisse der Versuche wurden sowohl in beschreibenden Protokollen als auch in Resistenztabellen festgehalten.

Erklärungen zu den Tabellen:

Alle Versuche, von denen Tabellen beiliegen, wurden mit den Konzentrationen 1 : 1000 bzw. 1 : 2000, 1 10.000, 1 : 100.000 und 1 : 500.000 durchgeführt. Von solchen Versuchen, bei denen die angewandten Konzentrationen keine tödliche Giftwirkung oder keine Resistenzunterschiede zwischen den Versuchsobjekten zeigten, sind keine Tabellen beigegeben. Puffer wurden bei den Untersuchungen, von denen Tabellen vorliegen, nur bei Gentianaviolett verwendet, alle anderen Lösungen wurden nur mit Aqua bidest. hergestellt.

Die Zeichen der Tabellen bedeuten:

l = lebend, wenn keine Zahlenangaben vorher, dann alles lebend;
l′ = alles lebend, nur einzelne Zellen tot;
g = stark geschädigt, wenn ohne Zahlenangabe, dann alle Zellen stark geschädigt;
+ = tot, wenn ohne Zahlenangabe, dann alle Zellen tot;
+′ = fast alle Zellen tot, nur noch einzelne lebendig.

Beispiel:

$\frac{1}{3}l\frac{1}{3}g = \frac{1}{3}$ der Zellen lebt, $\frac{1}{3}$ schwer geschädigt, $\frac{1}{3}$ tot.

Versuchsreihen mit Vitalfarbstoffen.

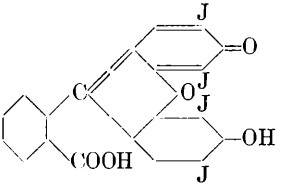
In die Versuche wurden zahlreiche saure und basische Farbstoffe einbezogen. Es soll hier nur über die größeren Resistenzreihen mit den sauren Vitalfarbstoffen Eosin und Erythrosin und den basischen Farbstoffen Gentianaviolett, Malachitgrün, Brillantgrün sowie Methylgrün ausführlicher berichtet werden. Mit Fluoreszein, Orange G, Nigrosin, Cyanol, Methylorange, Alizaringelb, Methylviolett, Vesuvin, Chrysoidin, Brillantchresylblau, Janusgrün, Anilinblau, Rhodamin B, Rhodamin S, Pyronin und Tropäolin 00 wurden nur kleinere Reihen mit wenigen Arten aufgestellt.

Während in der Literatur z. B. Erythrosin, Eosin, Methylviolett, Gentianaviolett, Malachitgrün und Brillantgrün als sehr giftig bezeichnet waren, galten Vesuvin, Brillantchresylblau, Rhodamin B und Pyronin als ziemlich harmlos. Nähere Untersuchungen über die vitale Färbbarkeit mit den obengenannten Farbstoffen stellten Pfeffer, Wulff, Gicklhorn, Strugger, Guilliermond, Schaede, Albach, Drawert und Yahama an (s. Literaturverzeichnis). Für die von mir in den großen Resistenzreihen untersuchten Farbstoffe wird von Drawert vitale Plasmafärbung bei entsprechendem p_H angegeben.

Versuche mit Xanthenfarbstoffen.

I. Erythrosin.

Formel



Gattermann 1943

Erythrosin oder Tetrajodfluoreszein ist ein Xanthenfarbstoff. Es gehört zu den Oxyfluorochromen und unterscheidet sich vom Eosin nur durch sein Halogen. Die Prüfung seiner elektrischen Wanderungsfähigkeit ergibt bei p_H 2,0 eine schwache und bei p_H 3,1—5,4 eine deutliche bis starke Wanderung zur Anode. Über die Vitalfärbung bei *Allium cepa* berichtet Drawert: Bei p_H 3,1—5,0 ist starke Kern- und Plasmafärbung zu beobachten, außerdem eine Anschwellung der Kerne und „Vakuolenkontraktion". Bei p_H 7,0 ist nur mehr eine schwache Färbung von Kern und Zytoplasma sichtbar. Strugger hat schon (1933) die Vitalfärbung mit Ery-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

throsin genau beschrieben und eine ungeheure Viskositätserhöhung im Plasma als typisches Zeichen der Giftwirkung dieses Farbstoffs feststellen können.

Im folgenden seien in Form verkürzter Protokollauszüge die wichtigsten Ergebnisse über einige Arten angeführt.

Netrium Digitus: Konzentration 1:2000.

Nach 1 bis 3 Std. waren alle Zellen noch ungefärbt und ihr plasmatischer Inhalt von unverändertem Aussehen. Sie plasmolysierten normal. Erst nach 3 Std. 10 Min. waren ungefähr 2% der Zellen schwach gefärbt.

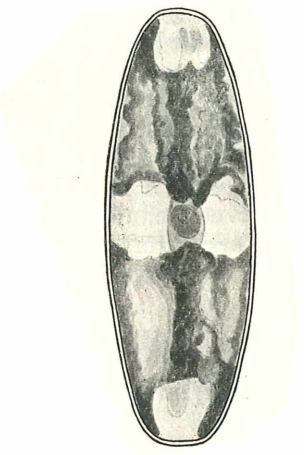


Abb. 1[3]. *Netrium Digitus,* nach zwölfstündiger Behandlung mit Erythrosin konz. 1 : 2000.

Nach 4 Std. waren fast 50% der Zellen deutlich gefärbt. Ihr Plasma war hellrot, die Chromatophoren rötlichgrün bis dunkelrot, manche sogar etwas bräunlich. 10% der Zellen plasmolysierten nicht mehr. Die Plastiden dieser Zellen waren bräunlichrot, ihr Plasma war intensiv hellrot, ebenso, aber etwas dunkler, der stark hervorgehobene Kern. Plasma und Plastiden zeigten Kontraktionserscheinungen. Die übrigen 50% fast ungefärbter Zellen sowie die Individuen mit schwach tingierten Plastiden gaben mehr oder weniger normale Plasmolyse. Nach 5 Std. waren 50% der Zellen intensiv gefärbt, ihre Chloroplasten fast, ihr Plasma deutlich rosa. Die übrigen Zellen (50%) waren schwächer tingiert, einzelne sogar noch fast ungefärbt. Insgesamt 15% waren nicht mehr plasmolysierbar, alle anderen zeigten einwandfrei Plasmolyse. Nach 6 Std. war bei zwei Dritteln der Zellen der Chromatophor stark gefärbt und oft leicht kontrahiert, das Plasma intensiv hellrot, die Kerne durch

[3] Herrn Doz. Dr. H. Schindler, bin ich für die Anfertigung der Zeichnungen zu großem Dank verpflichtet.

karminrote Färbung besonders deutlich sichtbar. Ein Drittel der Zellen war schwach gefärbt, der fast unveränderte Chromatophor schimmerte noch grünlich durch, auch der Kern war durch Färbung nicht besonders hervorgehoben. Gegen 20% plasmolysierten nicht mehr, 25% nur mehr in einer Form, die für starke Viskositätserhöhung des Plasmas sprach („Zerrplasmolyse" nach Schindler). Nach 12 Std. waren nur noch einzelne Zellen schwach oder fast gar nicht gefärbt. Die stark gefärbten Zellen zeigten vielfach außer Plastidenkontraktion und scheinbarer Kernschrumpfung auch eine Abhebung des Plasmas von der ganzen Zellwand; 50% aller Zellen waren nicht mehr plasmolysierbar. Auch die übrigen mehr oder weniger stark gefärbten Zellen zeigten mehr oder weniger krampfhafte Plasmolyseformen. Nach 16 Std. waren nur mehr einzelne Zellen schwach gefärbt, von den anderen war bei 30% das Plasma allseits von der Zellwand abgehoben; 75% plasmolysierten nicht mehr. Nach 25 Std. waren weniger als 3% schwach gefärbt; 80% plasmolysierten nicht mehr, wovon ungefähr die Hälfte Plasmaabhebungen von der Zellwand (von 5 μ und mehr) zeigten. Nach 50 Std. waren fast alle Zellen, bis auf einzelne überlebende, tot. Sie zeigten Koagulationserscheinungen und eine Kontraktion des plasmatischen Inhalts, die noch weiterging und nach 200 Std. ihr Maximum erreicht hatte.

Verdünnung 1:5000. Bis zu 30 Std. waren alle Zellen völlig unverändert, ungefärbt und plasmolysierten normal. Erst nach 50 Std. waren 4% deutlich gefärbt. Ihr Plasma war hellrot, ihr Chloroplast etwas dunkelrot. Eine besonders deutliche Kernfärbung zeigte sich noch nicht, diese war nur bei 1% der Zellen, welche auch nicht mehr plasmolysierten, zu sehen. Nach 100 Std. waren erst 6—8% ähnlich gefärbt, nur 4% plasmolysierten nicht. Die toten Zellen zeichneten sich durch intensivste Kern- und Plastidenfärbung aus. Nach 200 Std. waren erst 12% deutlich gefärbt (so wie nach 100 Std. die 6—8%), 9—10% plasmolysierten nicht mehr.

Verdünnung 1:10.000. Nach weit über 200 Std. war kaum 1% aller Zellen sichtbar gefärbt. Alle Zellen plasmolysierten normal.

Cosmarium amoenum: Verdünnung 1:2000.

Bis zu 20 Std. zeigte keine der Zellen deutliche Färbung, man sah weder morphologische Veränderungen noch solche im Plasmolyseverhalten. Erst nach 25 Std. waren 5% gefärbt. Ihr Chloroplast, der mehr oder weniger kontrahiert war, wies intensive rote, das Plasma hellrote Tingierung auf. Ihr Kern war nicht besonders hervorgehoben, doch schien die Pyrenoidgegend stärker tingiert. 3% waren nicht mehr plasmolysierbar. 95% ungefärbte und unveränderte Zellen plasmolysierten normal. Nach 52 Std. hatte sich der Anteil der gefärbten Zellen auf 20% und der der toten auf über 10% erhöht, hier war die Plastidenkontraktion deutlich sichtbar. Nach 90 bzw. 100 Std. betrug die Erhöhung beider Anteile 2 bzw. 4%. Nach ungefähr 250 Std. waren über 70% stark gefärbt, die zum großen Teil schwache Plastidenkontraktion zeigten. Nach 360 Std. waren über 90% der Zellen tot. Der plasmatische Inhalt war stark kontrahiert und die Plastidenmasse vom gleich stark tingierten Plasma nicht mehr zu unterscheiden. Die überlebenden Zellen waren durchwegs schwächer gefärbt, zeigten keine besonders deutliche Kernfärbung und meist schwach krampfige Plasmolyse.

Verdünnung 1:5000. Nach ungefähr 250 Std. war noch keine Zelle deutlich gefärbt und alle zeigten normale Plasmolyse. Erst nach 350 Std. betrug der Anteil der toten Individuen gegen 15%, bei den überlebenden Zellen zeigte sich keine deutliche Färbung oder Veränderung des Plasmolyseverhaltens.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Verdünnung 1:10.000. Nach 350 Std. waren noch alle Zellen ungefärbt und zeigten keinerlei morphologische Veränderung, noch eine solche im Plasmolyseverhalten.

Desmidium Swartzii: Verdünnung 1:2000.

Während nach 15 Std. sich noch keinerlei Wirkung feststellen ließ, waren nach 20 Std. 7% der Zellen tot. Ihr Zellinhalt war stark kontrahiert, die Plastidenmasse konnte vom stark tingierten Plasma ebensowenig unterschieden werden wie der Kern. Nach 100 Std. hatte sich die Rate der Toten auf 20% erhöht. Die überlebenden Zellen erschienen ungefärbt, ihre Plastiden grün, sie plasmolysierten normal. Bei der Verdünnung 1 : 10.000 sind auch nach über 200 Std. noch ungefähr 90% nicht deutlich gefärbt, noch sonst irgendwie verändert; sie plasmolysierten normal.

Eremosphaera viridis: Verdünnung 1:2000.

Nach 100 Std. war keine der Zellen deutlich gefärbt oder morphologisch verändert. Auch nach 150 Std. zeigte keine der Zellen deutliche Färbung, wohl aber war bei 50% eine leichte Plastidensystrophe im zentralen Teil der Zelle sichtbar; sonst war keine Veränderung zu sehen. Nach 200 Std. hatte sich der Anteil dieser pathologischen Individuen auf 60% erhöht; sonst war das Bild, dem Status von 150 Std. gegenüber, unverändert. Bei Verdünnung 1 : 5000 und 1 : 10.000 zeigten sich nach 150 Std. nur einzelne solcher pathologischer Zellen.

Scenedesmus (alle Arten): Verdünnung 1:2000.

Alle Arten dieser Gattung verhielten sich gleich. Nach 200 Std. war noch keine deutlich gefärbte oder sonst irgendwie veränderte Zelle zu finden.

Stigeoclonium tenue: Verdünnung 1:2000.

Nach 6 Std. waren nur die Haarzellen und einige chlorophyllfreie Zellen gefärbt und tot. Der stark kontrahierte und gleichmäßig tingierte Zellinhalt ließ keine Einzelheiten mehr erkennen. Nach 24 Std. waren bereits 90% der Zellen gefärbt und 50% von allen tot. Bei den noch vitalgefärbten Zellen hob sich der Chromatophor nur schwach vom fast gleich tingierten Plasma ab. Nach 79 Std. hatte sich der Anteil der toten um weitere 20% erhöht. Erst nach 170 Std. waren alle Zellen abgestorben. Die Färbung griff sukzedan von den Haarzellen oder von verwundeten Basiszellen auf die übrigen weiter.

Chaetophora elegans: Verdünnung 1:2000.

Nach 140 Std. waren nur einzelne Zellen, besonders die Spitzenzellen, tot, ihr Inhalt kontrahiert und stark gefärbt. Plastiden und Kerne waren infolge gleicher Färbungsintensität des Zytoplasmas nicht zu erkennen. Alle lebenden Zellen waren ungefärbt und plasmolysierten normal.

Erythrosin 1:2000	6	16	20	54	72	100
	Stunden					
Netrium Digitus .	$\frac{1}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ +	+	+	+	+
Netrium oblongum . .	$\frac{1}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ +	+	+	+	+
Cylindrocystis Brebissonii .	$\frac{1}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	+	+	+	+
Spirotaenia condensata	l	l	l	l	l	l
Penium Cylindrus	l	l	l	l	l	l
Penium phymatosporum .	l	l	l	l	l	l

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Erythrosin 1:2000	6	16	20	54	72	100
			Stunden			
Closterium Libellula	l	l	l	l	l	l
Closterium acutum	l	l	l	l	$\frac{3}{4}$ l	$\frac{1}{2}$ +
Closterium parvulum	l	l′	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g′	$\frac{1}{2}$ +	$\frac{2}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ +
Closterium Dianae	l	l′	l′	$\frac{2}{3}$ l	$\frac{2}{3}$ l	$\frac{1}{2}$ +
Closterium pronum	l	l	l	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{4}$ g	$\frac{1}{2}$ +	$\frac{3}{4}$ +
Closterium striolatum .	l	l	l	l	l	l
Closterium didymothocum .	l	l	l	l	l	l
Pleurotaenium Ehrenbergii	l	l	l	l	l	l
Pleurotaenium nodulosum	l	l	l	l	l	l
Tetmemorus granulatus	l	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{2}$ g	$\frac{1}{3}$ l $\frac{2}{3}$ g	$\frac{1}{2}$ g	$\frac{1}{2}$ g $\frac{1}{2}$ +	—
Cosmarium conspersum	l	l	l′	$\frac{3}{4}$ l	$\frac{3}{4}$ l	$\frac{2}{3}$ l
Cosmarium amoenum .	l	l	l	l′	l′	$\frac{2}{3}$ l′
Cosmarium tetraophtalmum	l	l	l	l	l′	—
Euastrum oblongum	l	l	l	l	l	l
Euastrum insigne	l	l	l	l	l	l
Euastrum affine	l	l	l	l	l	l
Euastrum ansatum	l	l	l	l	l	l
Euastrum binale	l	l	l	l	l	l
Micrasterias rotata	l	l	l	—	—	—
Micrasterias crenata	l	l	l	l′	l′	$\frac{3}{4}$ l
Micrasterias truncata	l	l	l	l′	l′	l
Staurastrum muticum	l	l	l	l	l	l
Straurastrum Dickiei	l	l	l	l	l	l
Staurastrum teliferum .	l	l	l	l	l	l
Staurastrum Heimerlianum	l	l	l	l	l	l
Staurastrum scabrum	l	l	l	l	l	l
Hyalotheca mucosa	l	l	l	l	l	l
Onychonema filiforme	l	l	l	l	l	l
Desmidium Swartzii .	l	l	l	l	l	l
Gloeococcus Schroeteri	l	l	l	l	l	l
Schizochlamys delicatula	l	l	l	l	l	l
Asterococcus superbus	l	l	l	l	l	l
Pediastrum tricornutum	l	l	l	l	l	l
Pediastrum glanduliferum	l	l	l	l	l	l
Pediastrum Boryanum	l	l	l	l	l	l
Chlorella vulgaris .	l	l	l	l	l	l
Eremosphaera viridis .	l	l	l	l	l	l
Chlorococcum botryoides	l	l	l	l	l	l
Oocystis Naegelii	l	l	l	l	l	l
Oocystis solitaria	l	l	l	l	l	l
Oocystis elliptica .	l	l	l	l	l	l
Scenedesmus bijugatus	l	l	l	l	l	l
Scenedesmus acutiformis	l	l	l	l	l	l
Scenedesmus quadricauda	l	l	l	l	l	l
Raphidium falcatum	l	l	l	l	l	l
Raphidium Braunii .	l	l	l	l	l	l
Dictyosphaerium Ehrenbergianum	l	l	l	l	l	l
Dictyosphaerium reniforme	l	l	l	l	l	l
Sorastrum bidentatum .	l	l	l	l	l	l
Dimorphococcus lunatus	l	l	l	l	l	l
Geminella mutabilis	l	l	l	l	l	l

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Erythrosin 1:2000	6	16	20	54	72	100
	Stunden					
Geminella minor	1	1	1	1	1	1
Draparnaldia glomerata	1	1	1	1	1	1′
Chaetophora elegans	1	1	1	1	1	1′
Stigeoclonium tenue	1	1	1′	$\frac{1}{2}$+	$\frac{2}{3}$+	$\frac{2}{3}$+
Microthamnion Kützingianum	1	1	1	1	1	1
Aphanochaete repens . .	1	1	1	1	1	$\frac{2}{3}$1 $\frac{1}{3}$g
Chaetosphaeridium Pringsheimii	1	1′	1′	$\frac{4}{5}$1	$\frac{3}{4}$1	$\frac{2}{3}$1
Microspora floccosa .	1	1	1	1	1	1
Characiopsis acutiformis	1	1	1	1	1	1
Ophyocytium parvulum	1	1	1	1	1	1
Chlorobotrys regularis	1	1	1	1	1	1

Die ersten Versuche mit Erythrosin wurden an verschiedensten Arten in schwach diffusem Licht (vgl. Strugger 1933) und parallel dazu unter vollständigem Lichtabschluß durchgeführt. Die Resultate zeigten keinen Unterschied in der Wirkung des Farbstoffes. Die Schädigung der Zellen wurde also, soweit eine solche sichtbar war, durch den Farbstoff als solchen hervorgerufen, ohne daß photodynamische Wirkung beteiligt war. „Giftwirkung" zeigte sich sowohl bei Conjugaten als auch bei Chlorophyceen. Bei letzteren konnte aber bei keiner der untersuchten *Protococcalen* und *Tetrasporalen* eine Schädigung nachgewiesen werden. Unter den *Ulothrichalen* waren die Oedogoniaceen (*Oedogonium* und *Bulbochaete*), von den Ulothrichaceen, *Geminella* und *Microspora* von der Farbe sehr lange unbeeinflußt. Bei den Chaetophoraceen wiesen von *Microthamnion, Draparnaldia* und *Chaetophora* nur einzelne Zellen, und zwar besonders die Spitzenzellen, Schädigung bzw. Färbung des Plasmas auf. *Stigeoclonium*, ebenfalls aus der Familie der Chaetophoraceen, zeigte eine starke Empfindlichkeit. Von den Chaetopeltidaceen wurde *Chaetosphaeridium* durch Erythrosin bald geschädigt, ebenso, nur in noch stärkerem Maße, *Aphanochaete repens* (Aphanochaetaceen).

Unter den Conjugaten war aus der Familie der Mesotaeniaceen *Spirotaenia condensata* von Erythrosin unbeeinflußt. Dagegen wurden die untersuchten *Netrium*-Arten sehr bald stark geschädigt, ebenso *Cylindrocystis*. Von den Desmidiaceen waren *Staurastrum, Euastrum, Hyalotheca, Onychonema* und *Pleurotaenium* äußerst unempfindlich. Die Arten von *Closterium* verhielten sich ganz verschieden. Besonders resistent schien *Closterium striolatum* zu sein. Auch in der Gattung *Cosmarium* ergaben sich einige Färbungs- und Resistenzunterschiede.

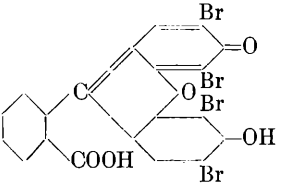
Gemeinsamkeiten im Resistenzverhalten größerer Gruppen oder Familien konnten nicht durchgehend festgestellt werden. Ein-

zelne Gattungen zeigten sehr große Ähnlichkeit. So erschienen die Arten der Gattung *Scenedesmus* oder die untersuchten *Pediastrum*-Arten alle ganz unempfindlich, hingegen die untersuchten *Netrium*- und *Cylindrocystis*-Arten hoch empfindlich gegen die Erythrosineinwirkung. *Cosmarium* und *Closterium* sind Gattungen, die keine durchgehende Gemeinsamkeit in bezug auf das Resistenzverhalten zeigen.

Jahreszeitliche Schwankungen in der Erythrosinresistenz waren, soweit meine Beobachtungen reichen, nicht festzustellen, obwohl zu den Hauptversuchen im Oktober und November Parallelversuche im März und im Juni durchgeführt wurden. Außerdem zeigten Individuen von gleicher Artzugehörigkeit, auch wenn sie von verschiedenen Standorten — sowohl im geographischen als im ökologischen Sinn — stammten, gleiches Resistenzverhalten.

II. Eosin.

Formel



Wieland 1943

Eosin oder Tetrabromfluoreszein unterscheidet sich vom Erythrosin nur im Halogen. Die Prüfung seiner elektrischen Wanderungsfähigkeit ergab bei p_H 2,0 eine schwache und bei p_H 3,1 bis 11 eine starke Wanderung zur Anode, was auf die saure Natur des Farbstoffes hinweist. Drawert gibt bezüglich der Vitalfärbung bei *Allium cepa* an: von p_H 3,1—4,6 ist deutliche Kern- und Plasmafärbung mit Vakuolenkontraktion zu sehen. Über p_H 6,8 wird die Tinktion immer undeutlicher.

Zur Orientierung sei ein zusammenfassender Auszug aus meinem Protokoll gegeben.

Netrium Digitus: Verdünnung 1:2000.

Nach 6 Std. war nur eine schwache, aber deutliche Kernfärbung bei 90% der Zellen zu bemerken; sonst trat keine Veränderung auf, die Zellen plasmolysierten normal. Auch nach 10 Std. war das Bild noch ungefähr dasselbe. Nach 30 Std. waren 50% tot. Ihr Chloroplast war bräunlichrot, das Plasma schwach hellrot, der Kern tiefrot. Die lebenden Zellen zeigten keine deutliche Plasmafärbung, grüne Plastiden, sehr schwach gefärbte Kerne und normale Plasmolyse. Nach 70 Std. war die Rate der toten auf fast 90% erhöht, nach 100 Std. gab es keine überlebenden

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Zellen mehr. Der protoplasmatische Zellinhalt war nun allseits von der Wand abgehoben und stark geschrumpft.

Cylindrocystis Brebissonii: Konzentration 1:2000.

Diese Alge zeigte in großen Zügen den gleichen Nekroseverlauf wie *Netrium Digitus.*

Eosin	6	16	20	54	72	100
1:2000		Stunden				
Netrium Digitus	l	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{2}$ g	$\frac{1}{2}$ +	$\frac{2}{3}$ +	+′	+
Netrium oblongum .	l	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{2}$ g	$\frac{2}{3}$ l	$\frac{2}{3}$ +	+′	+
Cylindrocystis Brebissonii .	l	l	–	+	+	+
Penium minutum	l	l	l	l	l	l
Penium phymatosporum	l	l	l	l	l	l
Closterium Dianae	l	l	l	l	l	l
Closterium striolatum	l	l	l	l	l	l
Tetmemorus granulatus	l	l	l	l	l	l
Cosmarium cucurbita	l	l	l	l	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{2}{3}$ g
Cosmarium crenatum	l	l	l	l	l	–
Cosmarium conspersum	l	l	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g
Cosmarium amoenum	l	l	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g
Euastrum oblongum .	l	l	l	l	l	–
Euastrum ansatum	l	l	l	l	l	l
Euastrum elegans .	l	l	l	l	l	–
Micrasterias truncata	l	l	l	l	l	l
Staurastrum muticum	l	l	l	l	l	l
Staurastrum scabrum	l	l	l	l	l	l
Staurastrum furcigerum	l	l	l	l	l	l′
Hyalotheca mucosa .	l	l	l	l	l	l
Gymnozyga Brebissonii	l	l	l	l	l	l
Pediastrum tricornutum	l	l	l	l	l	l
Chlorella vulgaris .	l	l	l	l	l	l
Eremosphaera viridis	l	l	l	l	l	–
Oocystis Naegelii	l	l	l	l	l	l
Oocystis solitaria . .	l	l	l	l	l	l
Scenedesmus quadricauda	l	l	l	l	l	l
Scenedesmus acutiformis	l	l	l	l	l	l
Dictyosphaerium Ehrenbergianum	l	l	l	l	l	l
Geminella mutabilis	l	l	l	l	l	l
Mesogerron fluitans	l	l	l	l	l	l
Chaetophora elegans	l	l	l	l	l	–
Chlorobotrys regularis	l	l	l	l	l	l

Die übrigen Desmidialen zeigten innerhalb von 100 Std. keine deutliche Färbung, auch keine besonders gut sichtbare Kernfärbung. Ihre Chloroplasten waren schön grün, ihr Plasmolyseverhalten normal. Auch die Bewegung der Kristalle in den Endvakuolen der Closterien und Pleurotaenien blieb ungestört.

Die untersuchten Chlorophyceen zeigten bei Verdünnung 1:2000 keinerlei sichtbare Schädigung durch den Farbstoff und plasmolysierten normal.

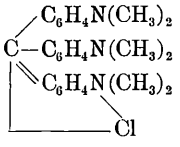
Die Verdünnung 1 : 10.000 schien für alle zum Versuch herangezogenen Algen unschädlich zu sein. *Mesogerron* zeigte nach mehrtägiger Einwirkung von Eosin in Verdünnung 1 10.000 und auch in 1 : 2000 noch Zellteilungen.

Zwischen artgleichen Individuen von verschiedenen Standorten sowie zwischen den Resultaten der Versuche im November und den im Juni durchgeführten, ließen sich keine nennenswerten Differenzen feststellen.

Versuche mit basischen Farbstoffen.

I. Gentianaviolett.

Formel



Pappenheim 1920

Gentianaviolett gehört zu den Karboniumfarbstoffen. Es ist ein dem Methylviolett nahverwandter Triphenylmethanfarbstoff. Über die Vitalfärbung und das elektrische Wanderungsvermögen berichtet Drawert: Bei p_H 2—8 ist eine deutliche Wanderung zur Kathode, bei p_H 9—11,5 keine eindeutige Bewegung mehr wahrzunehmen. Wir haben also einen basischen Farbstoff vor uns. Die Vitalfärbungsversuche an Schuppen von Allium cepa ergaben nach Drawert folgendes: Bei p_H 3—10 waren in der oberen Epidermis die Membran, das Plasma und der Kern gefärbt, die untere Epidermis zeigte Membran und Vakuolenfärbung. Bei p_H 11,5 war in der oberen Epidermis reine Kern- und Plasmafärbung, in der unteren Epidermis reine Vakuolenfärbung zu finden.

Im folgenden sei eine kurze Zusammenfassung meiner Protokolle gegeben.

Netrium Digitus Verdünnung 1:5000 p_H 10,3.

Nach 10 Min. zeigten alle Zellen schwache Plasmafärbung. Im Zellinhalt und zum Teil im Plasma lagen Aggregate kleiner Partikeln, die bei der Plasmolyse mit den Plasmamenisken fortgeschleppt wurden. Die Chloroplasten der gefärbten Zellen begannen sich leicht zu kontrahieren. Nach 30 Min. plasmolysierten nur über 80%, davon konnten nur mehr über 15% reibungslos deplasmolysieren. Bei den noch vital gefärbten Zellen hob sich der Chloroplast durch einen scheinbar dunkleren Farbton ab, während der Kern sich durch keine besonders starke Färbungsdifferenz gegenüber dem Plasma auszeichnete. Nach 90 Min. sind über 60% tot.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Die lebenden Individuen zeigten eine Verstärkung der Färbungsintensität. Nach 3 Std. gab es nicht einmal mehr überlebende Einzelzellen. Der protoplasmatische Inhalt der toten Zellen war allseitig abgehoben und stark kontrahiert. Die Deformation sowie die mehr oder weniger gleich starke Färbung aller Zellbestandteile machte deren Identifizierung unmöglich.

Cosmarium amoenum: Verdünnung 1:5000 p_H 10,3.

Nach 10 Min. lebten noch alle Zellen. Ihre Membranen waren trotz des hohen p_H stark gefärbt. Sie plasmolysierten alle in $CaCl_2$ unter Abrundung der Protoplasten. Auch nach 90 Min. waren noch alle Zellen gut plasmolysierbar. Ihr Plasma erschien fast ungefärbt, ihre Plastiden normal grün und ihr anatomischer Bau völlig unverändert. Erst nach 3 Std. waren ungefähr 5% tot, die übrigen Zellen sahen so aus wie nach 90 Min.

Bei *Closterium parvulum* waren nach 40 Min., bei *Closterium Dianae* nach 90 Min. alle Zellen tot.

Hyalotheca mucosa: Verdünnung 1:5000 p_H 10,4.

Nach 10 Min. war bei 20% der Zellen die Plastidenmasse violett gefärbt, die übrigen hatten normale grüne Chloroplasten. Eine deutliche Kern- und Plasmafärbung konnte nicht beobachtet werden. Nach 20 Min. waren bereits 50% der Zellen tot. Die noch lebenden Zellen zeigten deutliche Violettfärbung der Plastiden. Nach 30 Min. waren alle Zellen tot. Ihr Inhalt war kontrahiert, koaguliert und intensiv, jedoch mehr oder weniger homogen gefärbt. Auch Membranfärbung war nun aufgetreten.

Oocystis Naegelii: Verdünnung 1:5000 p_H 10,4.

Nach 1 Std. färbte sich das Plasma aller Zellen hellviolett, die Plastiden etwas dünkler. Das Plasmolyseverhalten war normal. Nach 2 Std. hatte sich der Inhalt aller Zellen gleichmäßig violett gefärbt, diese selbst waren jedoch noch plasmolysierbar. Nach 3 Std. zeigte eine homogene tiefviolette Färbung des allseits von der Wand abgehobenen Plasmas den Tod aller Individuen an. Plasmolytika, und zwar besonders $CaCl_2$, verstärkten die Kontraktion des plasmatischen Zellinhalts.

Bei *Scenedesmus* erschienen nach 3 Std. in Verdünnung 1:5000 alle Zellen ungefärbt und plasmolysierten normal.

Chaetophora elegans: Verdünnung 1:5000 p_H 10,4.

Nach 1 Std. waren 15% der Zellen tot, vorwiegend peripher gelegene. Der plasmatische Inhalt erschien koaguliert und homogen tiefviolett. Die lebenden Zellen wiesen weder deutliche Färbung noch eine Änderung im Plasmolyseverhalten auf. Nach 3 Std. sind 50% der Zellen tot. Die lebenden Zellen waren weiterhin unverändert. Erst nach $4^1/_2$ Std. waren alle Zellen tot. Färbung und Nekrose schritten kontinuierlich von der Peripherie der Pflanze gegen das Zentrum hin fort.

Gentianaviolett 1:5000 p_H 10,3		6	16	20	54	72
		Stunden				
Netrium Digitus	+	+	+	+	+	+
Netrium oblongum . .	+	+	+	+	+	+
Cylindrocystis Brebissonii .	+	+	+	+	+	+
Closterium striolatum	l	$\frac{2}{3}$l $\frac{1}{3}$g	$\frac{1}{3}$l $\frac{2}{3}$g	$\frac{2}{3}$g $\frac{1}{3}$+	–	–
Closterium Dianae	+	+	+	+	+	+
Closterium parvulum	+	+	+	+	+	+

Gentianaviolett 1:5000 p_H 10,3	3	6	16	20	54	72
	Stunden					
Closterium acutum .	l	$\frac{2}{3}$l $\frac{1}{3}$g	$\frac{1}{3}$g $\frac{2}{3}$+	+	+	+
Tetmemorus granulatus	+	+	+	+	+	+
Tetmemorus Brebissonii	+	+	+	+	+	+
Cosmarium palangula	l	$\frac{3}{4}$l	$\frac{1}{2}$+	$\frac{2}{3}$+	+	+
Cosmarium amoenum .	l′	$\frac{3}{4}$l	$\frac{2}{3}$+	$\frac{1}{3}$g $\frac{2}{3}$+	+	+
Cosmarium tetraophtalmum	l	$\frac{2}{3}$l	$\frac{1}{2}$+	+	+	+
Euastrum ansatum	$\frac{2}{3}$l	$\frac{1}{2}$+	$\frac{1}{2}$+	+	+	+
Micrasterias truncata	l	g	$\frac{1}{2}$g $\frac{1}{2}$+	+	+	+
Micrasterias crenata	l	g	$\frac{1}{2}$g $\frac{1}{2}$+	+	+	+
Micrasterias rotata	l	g	$\frac{1}{2}$g $\frac{1}{2}$+	+	+	+
Staurastrum muticum	l	l	$\frac{1}{2}$l $\frac{1}{2}$g	$\frac{2}{3}$g $\frac{1}{3}$+	$\frac{2}{3}$+	+
Staurastrum teliferum .	l	$\frac{2}{3}$l $\frac{1}{3}$g	$\frac{1}{2}$l $\frac{1}{2}$g	$\frac{1}{2}$g $\frac{1}{2}$+	$\frac{2}{3}$+	+
Staurastrum muricatum	l	l	$\frac{1}{2}$l $\frac{1}{2}$g	$\frac{1}{2}$g $\frac{1}{2}$+	+	+
Staurastrum botryophillum	l	l	$\frac{1}{2}$l $\frac{1}{2}$g	$\frac{1}{2}$g $\frac{1}{2}$+	+	+
Staurastrum scabrum .	l	l	$\frac{1}{2}$l $\frac{1}{2}$g	$\frac{2}{3}$g $\frac{1}{3}$+	$\frac{2}{3}$+	+
Staurastrum Heimerlianum	l	l	$\frac{1}{2}$l $\frac{1}{2}$g	$\frac{1}{2}$g $\frac{1}{2}$+	+	+
Hyalotheca mucosa .	$\frac{1}{3}$g $\frac{2}{3}$+	+	+	+	+	+
Asterococcus superbus	l	g	g	+	+	+
Gloeococcus Schroeteri	l	l′	g	+	+	+
Schizochlamys delicatula	l	g	$\frac{1}{2}$g $\frac{1}{2}$+	+	+	+
Tetraspora lubrica .	l	$\frac{2}{3}$l $\frac{1}{3}$g	+	+	+	+
Pediastrum tricornutum	l	l	g	$\frac{2}{5}$+	+	+
Pediastrum glanduliferum	l	l	g	$\frac{2}{3}$+	+	+
Pediastrum Boryanum	l	l	g	$\frac{2}{3}$+	+	+
Eremosphaera virdis .	+	+	+	+	+	+
Dictyosphaerium Ehrenbergianum	$\frac{2}{3}$+	+	+	+	+	+
Oocystis solitaria	$\frac{1}{3}$l $\frac{2}{3}$g	+	+	+	+	+
Oocystis Naegelii	+	+	+	+	+	+
Oocystis elliptica . .	g	+	+	+	+	+
Scenedesmus quadricauda	l	l	g	g	+	+
Scenedesmus acutiformis	l	l	g	g	+	+
Chaetophora elegans	$\frac{1}{2}$+	+	+	+	+	+
Stigeoclonium tenue	+	+	+	+	+	+
Aphanochaete repens . . .	g	g	+	+	+	+
Chaetosphaeridium Pringsheimii	g	+	+	+	+	+

In den Konzentrationen 1 1000 und 1 2000 wirkte der Farbstoff zu rasch, um die Resistenzunterschiede zwischen den einzelnen Arten übersichtlich zu gestalten. In der Konzentration 1 : 10.000 wirkte der Farbstoff zu langsam, um bei längerer Versuchsdauer eine unschädliche Wirkung der Pufferlösung zu garantieren.

Allgemeiner Färbungs- und Nekroseverlauf.

Ein Teil der Arten wies auch bei dem hohen p_H von 10,3 noch Zellwandfärbung auf, die übrigen zeigten vorerst nur schwache Plasmafärbung. Das Zytoplasma war dabei hellviolett, die Plastiden erst normal grün, später immer intensiver violett.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Erst ziemlich spät begann sich der Kern durch besondere Färbungsintensität hervorzuheben. Gleichzeitig mit der Intensivierung der Plastidentinktion begann auch eine Veränderung im Plasmolyseverhalten einzutreten, die sich vor allem im schwächeren Abrundungsvermögen ausdrückte. Nicht lange nach diesem Vorgang begann auch eine mehr oder weniger gut feststellbare Plastidenkontraktion. Das Eintreten des Zelltodes war durch eine Intensivierung der Plasmafärbung und eine allseitige Abhebung des Zytoplasmas von der Zellwand gekennzeichnet.

Über das Resistenzverhalten im Vergleich zu den Verwandtschaftsverhältnissen kann folgendes gesagt werden: Die beiden *Netrium*-Arten und *Cylindrocystis* — also die untersuchten Mesotaeniaceen — erwiesen sich als sehr empfindlich. Ihnen kommen am nächsten in bezug auf Empfindlichkeit *Closterium Dianae*, *Closterium parvulum*, *Tetmemorus granulatus*, *Tetmemorus Brebissonii*, *Euastrum ansatum*, zwei *Micrasterias*-Arten sowie *Hyalotheca mucosa* waren weit weniger empfindlich, da man nach 3 Std. Farbeinwirkung noch lebende Zellen dieser vier Algen finden konnte. Besonders lang blieben die untersuchten Cosmarien und Staurastren am Leben. Sie zeigten lange Zeit mehr oder weniger starke Membranfärbung und nur schwache Plasmafärbung und plasmolysierten dabei noch normal. Von den Chlorophyceen waren die *Oocystis*-Arten, *Eremosphaera*, *Stigeoclonium* und *Dictyosphaerium* am empfindlichsten. Weit weniger angegriffen wurden *Asterococcus Gloeococcus*, *Schizochlamys delicatula* und *Chaetophora elegans*. *Aphanochaete repens* und *Chaetosphaeridium Pringsheimii* nahmen eine Mittelstellung bezüglich der Resistenz zwischen den zuvor genannten Gruppen ein. Am unempfindlichsten waren die untersuchten Pediastren und Scenedesmen. Nach 6 Std. war sogar noch der ganze Zellbestand dieser Algen am Leben.

Wenn man Conjugaten und Chlorophyceen als ganze Gruppen bezüglich ihrer Resistenz gegen Gentianaviolett vergleicht, kann man nicht behaupten, daß die Widerstandsfähigkeit gegen diesen Farbstoff ein Unterscheidungsmerkmal beider Gruppen wäre. Bei beiden Gruppen gab es sowohl sehr resistente als auch hochempfindliche Arten oder Artengruppen. Die wenigen Fälle von Resistenzähnlichkeiten innerhalb einer Gattung dürfen in ihrer Bedeutung nicht überschätzt werden.

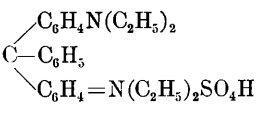
Eine jahreszeitlich bedingte Veränderung der Resistenz gegen Gentianaviolett konnte nicht in nennenswertem Ausmaß festgestellt werden, obwohl Versuche im November, März und Juni durch-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

geführt wurden. Algen der gleichen Art zeigten, auch wenn sie von geographisch und ökologisch verschiedenen Standorten stammten, das gleiche Resistenzverhalten.

II. Brillantgrün.

Formel



Pappenheim 1920

Brillantgrün (Solidgrün) ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der zu den Malachitgrünfarbstoffen gehört. Der Unterschied diesem Farbstoff gegenüber besteht vor allem darin, daß beim Brillantgrün die Methylgruppe des Malachitgrün durch Äthylgruppen ersetzt ist.

Auf Grund seiner elektrischen Wanderungsfähigkeit kann es zu den basischen Farbstoffen gezählt werden.

Zur Veranschaulichung der Wirkungsweise des Farbstoffes seien im folgenden einige kurze Protokollzusammenfassungen wiedergegeben.

Netrium Digitus Verdünnung 1:1000.

Nach 3 Std. waren ungefähr 50% aller Zellen tot. Der protoplasmatische Zellinhalt dieser Zellen war von der Membran allseits mehr oder weniger abgehoben und kontrahiert. Das Plasma erschien hell blaugrün gefärbt, in seiner koagulierten Masse lagen kleine dunkle Farbkügelchen von ungefähr 1—2 μ Durchmesser. Der Kern erreichte ungefähr die Färbungsintensität der stark tingierten geschrumpften Plastiden. Außerdem zeigten die toten Zellen eine leichte aber deutliche Membranfärbung. Auch im Innern der lebenden Zelle waren kleine Farbstofftröpfchen wahrzunehmen. Ihre Plastiden und Kerne waren schwach blau gefärbt, das Zytoplasma ganz hell bläulichgrün. Bereits nach 6 Std. waren alle Netrien tot. Die Kernfärbung trat bei dieser Alge schon längere Zeit vor dem Absterben auf, die erst undeutliche Membranfärbung intensivierte sich während des Absterbens.

In der Verdünnung 1:2000 sind nach 3 Std. erst 15% und nach 4 Std. über 20% tot. In der Verdünnung 1:10.000 begann der Farbstoff erst nach 10 Std. schädigend zu wirken.

Cosmarium amoenum: Verdünnung 1:2000.

Nach 4 Std. waren erst 5% deutlich geschädigt, bei diesen waren die Plastiden dunkelblau und etwas kontrahiert, das Plasma hellblau. Eine besonders hervorstechende Kernfärbung konnte nicht festgestellt werden. Bei den übrigen 95% der Zellen war die Membran schwach blaugrün gefärbt, der Inhalt zeigte keine deutliche Farbspeicherung. Alle Zellen, auch die 5% tingierten, zeigten einwandfreie Plasmolyse. Nach 6 Std. hatte sich die Rate der Individuen mit intensiver vitaler Plasmafärbung um 7% erhöht.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Cosmarium conspersum verhielt sich so ähnlich wie *Cosmarium amoenum* (in 1 : 1000). Es zeigte den gleichen Nekroseverlauf; schwache Membranfärbung, dann Plasma- und Plastidenfärbung, später Intensivierung derselben und nur schwache Hervorhebung des Kerns; schließlich Plastiden- und dann auch Plasmakontraktion. Der zeitliche Verlauf der Nekrose war individuell verschieden. Nach 6 Std. zeigten über ein Drittel der Zellen deutliche Plasmafärbung, nach 16 Std. waren fast zwei Drittel tot. Erst nach ungefähr 50 Std. waren nur mehr einzelne Überlebende zu finden.

Brillantgrün 1 : 1000	6	16	20	50
		Stunden		
Netrium Digitus	+	+	+	+
Netrium oblongum . .	+	+	+	+
Cylindrocystis Brebissonii	+	+	+	+
Penium minutum	l	l	g	+
Penium crassiculum	l	l	g	+
Penium phymatosporum	l	l	g	+
Penium polymorphum	l	l	g	+
Closterium angustatum	l	$\frac{3}{4}$ l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{2}$ +
Closterium gracile	l	$\frac{3}{4}$ l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{2}$ +
Closterium acutum	l	l	g	+
Closterium Dianae .	l	$\frac{2}{3}$ l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{2}$ +
Tetmemorus granulatus .	l	$\frac{2}{3}$ g $\frac{1}{3}$ l	$\frac{2}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ +
Pleurotaenium Trabecula .	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{3}$ +
Pleurotaenium Ehrenbergii	l	l	l	$\frac{1}{4}$ g $\frac{1}{4}$ +
Pleurotaenium nodulosum	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{3}$ +
Cosmarium Cucurbita	l	g	$\frac{1}{3}$ +	+
Cosmarium connatum	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{3}{4}$ l	$\frac{2}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	+
Cosmarium pyramidatum . .	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ +	+′
Cosmarium pseudopyramidatum	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ +	+′
Cosmarium conspersum	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ +	+′
Cosmarium amoenum	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{2}$ g	$\frac{1}{2}$ +	−	+′
Cosmarium punctulatum	l	l	$\frac{2}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	$\frac{3}{4}$ +
Euastrum ansatum	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{4}{5}$ +	+′	+′
Euastrum sinuosum	$\frac{3}{4}$ l $\frac{1}{4}$ g	$\frac{2}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ +
Micrasterias rotata .	l	l	g	g
Micrasterias pinnatifida	l	l	g	+
Micrasterias truncata	l	l	g	g
Micrasterias crenata	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +
Staurastrum muticum	l	l	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{2}$ g	$\frac{1}{2}$ +
Staurastrum Dickiei .	l	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{2}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ +
Staurastrum O Mearii . .	l	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{2}{3}$ g	$\frac{3}{4}$ +
Staurastrum pseudopelagicum	l	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{2}{3}$ g	$\frac{3}{4}$ +
Staurastrum teliferum	l	l	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{2}$ g	$\frac{1}{2}$ +
Staurastrum scabrum	l	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{2}{3}$ g	+′
Staurastrum Simonyi	l	l	$\frac{2}{3}$ +	+′
Staurastrum furcigerum	l	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{2}{3}$ g	$\frac{3}{4}$ +
Staurastrum Heimerlianum	l	l	g	+
Staurastrum dejectum	l	l	g	+
Xanthidium armatum .	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +
Gymnozyga Brebissonii	l	l	g	+
Schizochlamys delicatula	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ +	+	+

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Brillantgrün 1:1000	6	16	20	50
		Stunden		
Pediastrum Boryanum	l	l	l	l
Pediastrum tricornutum	l	l	l	l
Coelastrum proboscideum	l	l	l	l
Oocystis Naegelii	l	l	l	l
Oocystis solitaria .	l	l	l	l
Scenedesmus costatus	l	l	l	l
Scenedesmus bijugatus .	l	l	l	l
Scenedesmus quadricauda	l	l	l	l
Raphidium falcatum . .	l	l	l	l
Raphidium falcatum var. spir.	l	l	l	l
Geminella mutabilis	l	l	l	l
Chaetophora elegans	$\frac{2}{3}$+	+	+	+
Chaetophora tuberculosa	$\frac{2}{3}$+	+	+	+
Oedogonium Itzigsohnii	l	l	l	l

Brillantgrün 1:10.000	6	16	20	50
		Stunden		
Netrium Digitus	l	g	$\frac{2}{3}$ g $\frac{1}{3}$+	+
Netrium oblongum . .	l	g	$\frac{2}{3}$ g $\frac{1}{3}$+	+
Cylindrocystis Brebissonii	l	g	$\frac{2}{3}$ g $\frac{1}{3}$+	+
Penium minutum	l	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{2}{3}$ g	$\frac{2}{3}$+
Penium crassiculum	l	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{2}{3}$ g	$\frac{2}{3}$+
Penium phymatosporum .	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$+
Penium polymorphum	l	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{2}{3}$ g	$\frac{1}{3}$+
Closterium angustatum	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{3}{4}$+
Closterium gracile	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$+
Closterium acutum	l	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{2}{3}$ g	$\frac{3}{4}$+
Closterium Dianae .	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{3}$+
Tetmemorus granulatus	l	$\frac{3}{4}$ l	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{4}$ g	$\frac{1}{3}$+
Pleurotaenium Trabecula .	l	l	l	l′
Pleurotaenium Ehrenbergii	l	l	l	l
Pleurotaenium nodulosum	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$+
Cosmarium Cucurbita	l	g	$\frac{3}{4}$ g $\frac{1}{4}$+	+
Cosmarium connatum	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{2}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ g $\frac{1}{3}$+	+′
Cosmarium pyramidatum . .	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$+	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$+	$\frac{3}{4}$+
Cosmarium pseudopyramidatum	l	$\frac{1}{3}$+	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$+	$\frac{3}{4}$+
Cosmarium conspersum	l	$\frac{1}{3}$+	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$+	$\frac{1}{3}$+
Cosmarium amoenum	l	$\frac{1}{3}$+	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$+	$\frac{1}{3}$+
Cosmarium punctulatum	l	l	$\frac{1}{3}$+	$\frac{1}{2}$+
Euastrum ansatum	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$+	$\frac{4}{5}$+
Euastrum sinuosum	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$+
Micrasterias rotata .	l	l	l	–
Micrasterias pinnatifida	l	l	l	l′
Micrasterias truncata	l	l	l	$\frac{3}{4}$ l
Micrasterias crenata	l	l	l	$\frac{3}{4}$ l
Staurastrum muticum	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$+
Staurastrum Dickiei .	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$+
Staurastrum O Mearii . .	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$+
Staurastrum pseudopelagicum	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$+

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Brillantgrün 1 : 10.000	6	16	20	50
	Stunden			
Staurastrum teliferum	l	l	$\frac{1}{3}$+	$\frac{1}{3}$g $\frac{1}{3}$+
Staurastrum scabrum	l	l	$\frac{2}{3}$l $\frac{1}{3}$g	$\frac{1}{3}$g $\frac{1}{3}$+
Staurastrum Simonyi	l	l	$\frac{2}{3}$l $\frac{1}{3}$g	$\frac{1}{3}$g $\frac{1}{3}$+
Staurastrum furcigerum	l	l	$\frac{2}{3}$l $\frac{1}{3}$g	$\frac{1}{3}$g $\frac{1}{3}$+
Staurastrum Heimerlianum	l	l	$\frac{1}{3}$l $\frac{2}{3}$g	$\frac{1}{3}$g $\frac{1}{3}$+
Staurastrum dejectum .	l	l	$\frac{1}{3}$l $\frac{2}{3}$g	$\frac{1}{3}$g $\frac{1}{3}$+
Xanthidium armatum .	l	l	l	—
Gymnozyga Brebissonii	l	l	$\frac{2}{3}$l $\frac{1}{3}$g	g
Schizochlamys delicatula	$\frac{1}{3}$l $\frac{2}{3}$g	$\frac{2}{3}$+	+	+
Pediastrum Boryanum	l	l	l	l
Pediastrum tricornutum .	l	l	l	l
Coelastrum proboscideum	l	l	l	l
Oocystis solitaria	l	l	l	l
Oocystis Naegelii	l	l	l	l
Oocystis elliptica .	l	l	l	l
Scenedesmus bijugatus	l	l	l	l
Scenedesmus costatus .	l	l	l	l
Scenedesmus quadricauda	l	l	l	l
Raphidium falcatum .	l	l	l	l
Raphidium falcatum var. spir.	l	l	l	l
Geminella mutabilis	l	l	l	l
Chaetophora elegans	$\frac{1}{3}$l $\frac{2}{3}$g	$\frac{1}{3}$g $\frac{1}{3}$+	+	+
Chaetophora tuberculosa	$\frac{1}{3}$l $\frac{2}{3}$g	$\frac{1}{3}$g $\frac{1}{3}$+	+	+
Oedogonium Itzigsohnii	l	l	l	l

Bei allen untersuchten Algen war der Nekroseverlauf ungefähr gleich. Zuerst zeigte sich eine leichte, oft undeutliche Membranfärbung. Während die Chloroplasten noch normal grün aussahen, begann sich das Plasma bereits schwach zu färben. Allmählich wurde die schwache aber deutliche Farbstoffspeicherung des Plasmas und die erst spät sichtbar gewordene der Plastiden stärker. Parallel mit der fortschreitenden Intensivierung der Färbung begann sich auch der Kern sichtbar abzuheben. Nach einer weiteren Verstärkung der Kern- und Plastidenfärbung begann sich auch der Chloroplast zu kontrahieren. Später zeigte eine allseitige Abhebung des Plasmas von der Zellwand den endgültigen Eintritt des Todes an.

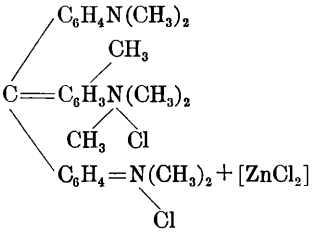
In quantitativer Hinsicht zeigten die Resultate keine sehr weitreichenden Resistenzähnlichkeiten. *Netrium* und *Cylindrocystis* verhielten sich ähnlich. Sie waren am empfindlichsten. *Penium* war weit weniger empfindlich, die Arten dieser Gattung zeigten große Einheitlichkeit im Resistenzverhalten. Innerhalb der Gattungen *Closterium* und *Cosmarium* waren die quantitativen Resistenzunterschiede beträchtlich, ebenso bei *Euastrum*. Recht einheitlich in bezug auf Widerstandsfähigkeit waren die Arten der Gattung

Pleurotaenium. An Empfindlichkeit reichten manche *Cosmarien* am ehesten an *Netrium* und *Cylindrocystis* heran. Von den untersuchten *Chlorophyceen* waren alle Arten, mit Ausnahme von *Chaetophora* und *Schizochlamys*, sehr unempfindlich.

Eine Resistenzveränderung zu verschiedenen Jahreszeiten konnte wieder ebensowenig festgestellt werden, wie ein Unterschied zwischen Individuen der gleichen Art, die von ökologisch oder geographisch verschiedenen Standorten stammten.

III. Methylgrün.

Formel



Pappenheim

Methylgrün ist ein Triphenylmethanfarbstoff aus der Gruppe der Rosaniline. Vom Methylviolett unterscheidet es sich formelmäßig und in der Struktur nur durch das Chlormethyl, das dem Methylviolett fehlt (nach Pappenheim). Es wandert im elektrischen Feld von p_H 2—7 eindeutig und dann mehr oder weniger undeutlich zur Kathode. Man kann es daher als basischen Farbstoff bezeichnen.

Über die Vitalfärbung an *Allium cepa* berichtet Drawert folgendes: Bei p_H 2 zeigten die Zellen keine deutliche Färbung. Bei p_H 3 waren in der oberen Epidermis Kerne und Zytoplasma gefärbt, die untere Epidermis blieb farblos. Von p_H 5—9 zeigte die obere Epidermis Kern- und Plasmafärbung, die untere Epidermis nur starke Vakuolenfärbung. Zwischen p_H 10 und 11,5 waren beide Epidermen farblos.

Einige Protokollauszüge sollen einen kurzen Überblick über die Giftwirkung des Stoffes geben.

Netrium Digitus: Verdünnung 1:2000.

Nach 1 Std. war bei allen Zellen das Plasma bereits deutlich gefärbt, sonst jedoch keine größere Veränderung wahrzunehmen. Die Plastiden hatten noch fast ihre normale Farbe, und der Kern hob sich noch nicht durch besonders starke Färbung ab. Im Zellsaftraum lagen zahlreiche kleine dunkle Farbstofftröpfchen. In großen Zügen boten alle Zellen dieses Bild und plasmolysierten normal. Die hellblaue Färbung des Plasmas nahm auch später nicht zu. Nach ungefähr 30 Std. waren 65% tot. Auch im

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Innern der toten Zellen sah man große Farbstoffkügelchen. Ihre Plastiden erschienen dunkelblau, ebenso der Kern stark tingiert, während das Plasma seine Färbung kaum intensiviert hatte. Bei den lebenden Zellen waren die Chloroplasten schön grün, das Plasma nur blaß hellblau, während der Kern fast farblos erschien. Nach 50 Std. gab es nur mehr einzelne Überlebende.

Verdünnung 1:10.000. Nach 50 Std. waren noch alle Individuen am Leben, ein großer Teil fast ungefärbt und die Färbungsintensität der übrigen äußerst schwach.

Cosmarium amoenum: Verdünnung 1:2000.

Nach 50 Std. wies noch keine der Zellen eine durch den Farbstoff bedingte Schädigung auf. Die in einigen Fällen vorhandene Plasmafärbung war sehr schwach, der Kern farblos und die Plastiden normal gelblichgrün.

Methylgrün 1:1000	6	16	20	54
	Stunden			
Netrium Digitus	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	$\frac{1}{3}$ g $\frac{2}{3}$ +
Netrium oblongum	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	$\frac{1}{3}$ g $\frac{2}{3}$ +
Penium minutum	l	l	l	l
Penium crassiculum	l	l	l	l
Penium phymatosporum	l	l	l	l
Penium polymorphum	l	l	l	l
Closterium Navicula	l	l	l	l
Closterium angustatum	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g
Closterium gracile	l	l	l	l
Closterium Dianae	l	l	l	l
Closterium acutum . .	l	l	l	l
Pleurotaenium Trabecula .	l	l	l	l
Pleurotaenium Ehrenbergii	l	l	l	l
Pleurotaenium nodulosum	l	l	l	l
Tetmemorus granulatus	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g
Cosmarium Cucurbita	l	l	l	l
Cosmarium connatum	l	l	l	l
Cosmarium pyramidatum . .	l	l	l	l
Cosmarium pseudopyramidatum	l	l	l	l
Cosmarium pachydermum	l	l	l	l
Cosmarium conspersum	l	l	l	l
Cosmarium amoenum	l	l	l	l
Cosmarium punctulatum	l	l	l	l
Cosmarium Portianum	l	l	l	l
Euastrum ansatum	l	l	l	l
Euastrum sinuosum	l	l	l	l
Micrasterias rotata .	l	l	l	l
Micrasterias pinnatifida	l	l	l	l
Micrasterias truncata	l	l	l	l
Micrasterias crenata	l	l	l	l
Staurastrum muticum	l	l	l	l
Staurastrum Dickiei	l	l	l	l
Staurastrum dejectum	l	l	l	l
Staurastrum Heimerlianum	l	l	l	l
Staur strum teliferum	l	l	l	l
Staurastrum scabrum	l	l	l	l
Staurastrum Simonyi	l	l	l	l

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Methylgrün 1:1000	6	16	20	54
	Stunden			
Staurastrum cingulum	l	l	l	l
Desmidium Swartzii .	l	l	l	l
Schizochlamys delicatula	+′	+	+	+
Clorococcus botryoides	l	l	l	l
Asterococcus superbus .	l	l	l	l
Dictyosphaerium Ehrenbergianum	l	l	l	l
Pediastrum tricornutum	l	l	l	l
Pediastrum Boryanum	l	l	l	l
Coelastrum proboscideum	l	l	l	l
Scenedesmus quadricauda	l	l	l	l
Scenedesmus bijugatus .	l	l	l	l
Scenedesmus bijugatus var. alt.	l	l	l	l
Scenedesmus costatus	l	l	l	l
Oocystis Naegelii	l	l	l	l
Oocystis solitaria	l	l	l	l
Oocystis elliptica	l	l	l	l
Raphidium falcatum	l	l	l	l
Raphidium falcatum var. spir.	l	l	l	l
Geminella mutabilis	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +
Aphanochaete repens	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g
Chaetophora elegans .	$\frac{1}{3}$ g $\frac{2}{3}$ +	$\frac{1}{4}$ g $\frac{3}{4}$ +	+	+
Chaetophora tuberculosa	$\frac{1}{3}$ g $\frac{2}{3}$ +	$\frac{1}{3}$ g $\frac{2}{3}$ +	+	+

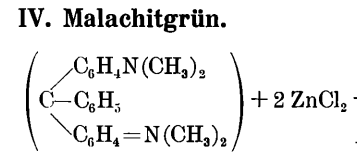
Methylgrün erwies sich im großen und ganzen in meinen Versuchen als recht ungiftig. Von allen untersuchten Konjugaten waren nur *Netrium Digitus* und *Netrium oblongum* sehr empfindlich. Diese beiden Arten zeigten weder in qualitativer noch in quantitativer Hinsicht eine Differenz im Resistenzverhalten. Von den Chlorophyceen waren *Eremosphaera, Schizochlamis* und *Chaetophora* ziemlich empfindlich. Alle anderen Arten der Chlorophyceen und Konjugaten zeigten keine besondere Empfindlichkeit gegen die Einwirkung von Methylgrün. *Cosmarium pyramidatum, Cosmarium pachydermum* und *Cosmarium conspersum, Euastrum ansatum, Cosmarium Cucurbita, Penium crassiculum, Penium phymatospornm* und *Penium polymorphum* zeigten nach 20, 24 und mehr Stunden zarte aber deutliche vitale Plasmafärbung bei normalem Plasmolyseverhalten. Die übrigen Arten waren nicht deutlich gefärbt, ihre Plastiden hatten normale grüne Farbe. Die Gegenüberstellung von *Netrium, Chaetophora* und *Schizochlamys* und der oben angeführten, lange Zeit vitale Plasmafärbung zeigende Arten, weist darauf hin, daß es sich hier um die Resistenz des ganzen Plasmas handelte und nicht bloß um die Widerstandskraft eines sehr resistenten Plasmalemmas.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Jahreszeitlich bedingte Resistenzschwankungen oder Verschiedenheiten bei Individuen der gleichen Art, die von ökologisch und geographisch verschiedenen Standorten stammten, konnten nicht festgestellt werden.

IV. Malachitgrün.

Formel



$$\left(C\begin{cases}C_6H_4N(CH_3)_2\\ C_6H_5\\ C_6H_4{=}N(CH_3)_2\end{cases}\right) + 2\,ZnCl_2 + 2\,H_2O$$

Pappenheim

Es ist dies ein Triphenylmethanfarbstoff aus der Gruppe der Malachitgrünfarben (Diamidotriphenylmethane). Es unterscheidet sich vom Brillantgrün vor allem durch sein Alkyl, das beim Malachitgrün nicht die Äthylgruppe ist, sondern die Methylgruppe. Vom Methylgrün ist es vor allem dadurch verschieden, daß es drei Phenylgruppen besitzt. Auf Grund seiner elektrischen Wanderungsfähigkeit — bei p_H 6 deutlich, bei p_H 7—11,1 undeutlich zur Kathode — wird es zu den basischen Farbstoffen gerechnet.

Über die Vitalfärbung an *Allium cepa* berichtet Drawert: Von p_H 3—10,5 zeigt die obere Epidermis Plasma- und Kernfärbung sowie Vakuolenkontraktion, die untere Epidermis nur Vakuolenfärbung. Bei p_H 11,5 sind beide Epidermen farblos.

Auch bei den Algen erwies sich Malachitgrün als Plasmafarbstoff. Das Plasma und die Plastiden zeigten lange ungefähr gleichstarke Tingierung, während der Kern sich am eigentlichen Beginn der Nekrose hervorhebt. Daß die Zellen noch einige Zeit nach der Plasmafärbung leben, zeigte die gute Plasmolysierbarkeit mit Traubenzucker und $CaCl_2$.

Ein verkürzter Protokollauszug soll die Giftwirkung dieses Farbstoffes vor Augen führen.

Penium minutum: Verdünnung 1:1000.

Nach 6 Std. und auch nach 16 Std. waren alle Zellen fast gar nicht gefärbt. Nach 20 Std. und noch nach 54 Std. hatte die helle, aber deutliche Färbung noch keine tiefgreifenden morphologischen Veränderungen hervorgerufen; bei Plasmolyse rundeten sich die Protoplasten, wenn auch nicht mehr so rasch wie normal. Nur einzelne Zellen waren im Absterben. Bei diesen war die Plasmolyse dort, wo sie überhaupt noch eintrat, krampfig. Die Plastiden waren meist leicht kontrahiert und der Kern durch Färbung deutlich hervorgehoben. Nach 76 Std. waren alle Zellen tot. Ihre Chloroplasten waren intensiv blau, die Kerne dunkelblau, das Zytoplasma hellgrünlichblau. Die Plastiden waren stark kontrahiert und deformiert, während sich das granulös erscheinende Zytoplasma allseits von der Wand abgehoben hatte.

Malachitgrün 1:1000	6	16	20	54	72
	Stunden				
Netrium Digitus	+	+	+	+	+
Netrium oblongum	+	+	+	+	+
Penium minutum	l	l	l	$\frac{3}{4}$ l $\frac{1}{4}$ g	+
Penium crassiculum	l	l	l	$\frac{3}{4}$ l $\frac{1}{4}$ g	+
Penium polymorphum	l	l	l	$\frac{3}{4}$ l $\frac{1}{4}$ g	+
Closterium Navicula	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	—	$\frac{1}{3}$ +	+
Closterium angustatum	$\frac{2}{3}$ l	$\frac{2}{3}$ l	$\frac{2}{3}$ l	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	+
Closterium striolatum	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l	$\frac{1}{4}$ g $\frac{1}{4}$ +
Closterium gracile	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l	+
Closterium Dianae	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l	$\frac{1}{2}$ +	$\frac{1}{2}$ +	+
Closterium parvulum	l	l′	l′	$\frac{3}{4}$ l	+
Closterium acutum .	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{3}$ g $\frac{2}{3}$ +
Pleurotaenium Trabecula .	l	l	l′	$\frac{3}{4}$ l	+
Pleurotaenium Ehrenbergii	l	l′	l′	$\frac{3}{4}$ l	+
Pleurotaenium nodulosum	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	+
Tetmemorus granulatus	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ +	$\frac{2}{3}$ +	+
Cosmarium Cucurbita	l	l′	l′	$\frac{3}{4}$ l	+
Cosmarium connatum	l	l′	l′	$\frac{3}{4}$ l	+′
Cosmarium pyramidatum .	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{4}$ g	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l	+
Cosmarium pseudopyramidatum	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l	+
Cosmarium pachydermum	l	l′	l′	$\frac{3}{4}$ l	+
Cosmarium conspersum	$\frac{3}{4}$ l $\frac{1}{4}$ g	$\frac{1}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{1}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ +	+
Cosmarium Portianum	l	l′	l′	$\frac{3}{4}$ l	+
Cosmarium punctulatum	l	l′	l′	$\frac{3}{4}$ l	+
Euastrum obesum	l	$\frac{1}{2}$ +	$\frac{1}{2}$ +	$\frac{2}{3}$ +	+
Euastrum ansatum	l	$\frac{1}{2}$ +	$\frac{1}{2}$ +	$\frac{1}{3}$ g $\frac{2}{3}$ +	+
Euastrum sinuosum	$\frac{2}{3}$ l	$\frac{2}{3}$ l	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +	+
Micrasterias rotata . .	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	+
Micrasterias pinnatifida	l	l	l	$\frac{3}{4}$ l	+
Micrasterias truncata	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	+
Micrasterias crenata	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	+
Staurastrum muticum	l	l	l	l	+
Staurastrum Dickiei	l	l′	l′	$\frac{3}{4}$ l	+′
Staurastrum scabrum	l	l	l	l	+
Staurastrum teliferum .	l	l	l′	$\frac{3}{4}$ l	$\frac{2}{3}$ +
Staurastrum furcigerum .	l	l′	l′	$\frac{3}{4}$ l	+′
Staurastrum Lütkemülleri	l	l	l′	$\frac{3}{4}$ l	+′
Staurastrum cingulum .	l	l	l	l	+
Xanthidium armatum	l	l′	l′	$\frac{3}{4}$ l	+
Desmidium Swartzii .	l	l′	l′	$\frac{3}{4}$ l	+
Gymnozyga Brebissonii .	l	l′	l′	$\frac{3}{4}$ l	+
Schizochlamys delicatula	l	l	—	—	—
Pediastrum tricornutum	l	l	l	l	l
Pediastrum Boryanum . .	l	l	l	l	l
Coelastrum proboscideum	l	l	l	l	l
Oocystis solitaria	l	l	l′	l′	l′
Oocystis Naeyelii	l	l	l′	l′	l′
Oocystis elliptica . .	l	l	l′	l′	l′
Scenedesmus quadricauda	l	l	l	l	l
Scenedesmus denticulatus	l	l	l	l	l
Scenedesmus costatus	l	l	l	l	l

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Malachitgrün 1:1000	6	16	20	54	72
	Stunden				
Scenedesmus bijugatus	l	l	l	l	l
Raphidium falcatum .	l	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g
Raphidium falcatum var. spir.	l	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g
Geminella mutabilis	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	g
Bulbochaete sp.	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ l
Oedogonium Itzigsohni	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	$\frac{2}{3}$ +
Chaetophora elegans	l	l	—	—	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +
Chaetophora tuberculosa	l	l	—	—	—

Malachitgrün 1:10.000	6	16	20	54	72
	Stunden				
Netrium Digitus	g	g	g	$\frac{1}{2}$ g $\frac{1}{2}$ +	+
Netrium oblongum	g	g	g	$\frac{1}{2}$ g $\frac{1}{2}$ +	+
Penium minutum	l	l	l	l	+
Penium crassiculum	l	l	l	l	+
Penium polymorphum	l	l	l	l	+
Closterium Navicula	l	l	l	l	+
Closterium angustatum	l	l	l	l	+
Closterium striolatum	l	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g
Closterium gracile	l	l	l	l	g
Closterium Dianae	l	l	$\frac{3}{4}$ l $\frac{1}{4}$ g	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	+
Closterium parvulum	l	l	l	l	g
Closterium acutum .	l	l	l	l	+
Pleurotaenium Trabecula	l	l	l	l	+
Pleurotaenium Ehrenbergii	l	l	l	l	+
Pleurotaenium nodulosum	l	l	l	l	+
Tetmemorus granulatus	l	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{4}$ g	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{4}$ g	$\frac{2}{3}$ l	+
Cosmarium Cucurbita	l	l	l	l	+
Cosmarium connatum	l	l	l	l	$\frac{1}{3}$ g $\frac{2}{3}$ +
Cosmarium pyramidatum . .	l	l	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	+
Cosmarium pseudopyramidatum	l	l	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	+
Cosmarium pachydermum	l	l	l	l	+
Cosmarium conspersum	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g	+
Cosmarium Portianum	l	l	l	l	+
Cosmarium punctulatum	l	l	l	l	+
Euastrum obesum .	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l	$\frac{3}{4}$ +
Euastrum ansatum	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l	$\frac{3}{4}$ +
Euastrum sinuosum	l	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{2}$ g	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{2}$ g	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{4}$ g	$\frac{1}{3}$ g $\frac{2}{3}$ +
Micrasterias rotata .	l	l	l	l	+
Micrasterias pinnatifida	l	l	l	l	+
Micrasterias truncata	l	l	l	l	$\frac{2}{3}$ +
Micrasterias crenata	l	l	l	l	$\frac{2}{3}$ +
Staurastrum muticum	l	l	l	l	$\frac{1}{3}$ g $\frac{1}{3}$ +
Staurastrum Dickiei	l	l	l	l	g
Staurastrum scabrum	l	l	l	l	+
Staurastrum teliferum	l	l	l	l	$\frac{1}{3}$ l $\frac{2}{3}$ g
Staurastrum furcigerum .	l	l	l	l	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{2}$ g
Staurastrum Lütkemülleri	l	l	l	l	$\frac{1}{2}$ l $\frac{1}{2}$ g
Staurastrum cingulum .	l	l	l	l	+

Malachitgrün 1 : 10.000	6	16	20	54	72
	Stunden				
Xanthidium armatum	l	l	l	l	+
Desmidium Swartzii . .	l	l	l	l	+
Gymnozyga Brebissonii	l	l	l	l	+
Schizochlamys delicatula	l	l	l	—	—
Pediastrum tricornutum	l	l	l	l	l
Pediastrum Boryanum	l	l	l	l	l
Coelastrum proboscideum	l	l	l	l	l
Oocystis solitaria	l	l	l	l	l
Oocystis Naegeli	l	l	l	l	l
Oocystis elliptica . .	l	l	l	l	l
Scenedesmus quadricauda	l	l	l	l	l
Scenedesmus denticulatus	l	l	l	l	l
Scenedesmus costatus	l	l	l	l	l
Scenedesmus bijugatus	l	l	l	l	l
Rhaphidium falcatum .	l	l	l	l	l
Raphidium falcatum var. spir. .	l	l	l	l	l
Geminella mutabilis	l	l	l	$\frac{3}{4}$ l $\frac{1}{4}$ g	—
Bulbochaete sp. . . .	l	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g
Oedogonium Itzigsohni	l	l	l	l	$\frac{2}{3}$ l $\frac{1}{3}$ g
Chaetophora elegans .	l	l	l'	—	—
Chaetophora tuberculosa	l	l	—	—	—

Penium polymorphum und *Penium crassiculum* zeigten fast den gleichen Nekroseverlauf und dieselben Widerstandsgrenzen wie *Penium minutum.*

Auch bei den anderen Desmidiaceengattungen finden wir in großen Zügen den bei *Penium minutum* skizzierten Nekroseverlauf wieder. Erst wurde eine leichte helle Plasmafärbung sichtbar, während die Plastiden noch ihre normale grüne Farbe behielten. Nachdem sich die Zytoplasmafärbung bedeutend verstärkt hatte, begannen auch die Chloroplasten, deutlich Farbstoff zu speichern. Bald darauf begann sich der Kern durch immer stärker werdende Farbstoffspeicherung vom Zytoplasma abzuheben. Während sich der Chloroplast dunkelblau färbte und sich allmählich kontrahierte, war die inzwischen intensivierte Tinktion des Plasmas in ein letales Stadium übergegangen.

Closterium striolatum nahm bezüglich des Resistenzverhaltens eine Sonderstellung ein, die vielleicht auf sein geringes Speichervermögen zurückzuführen wäre. Die Widerstandsgrenze der anderen Closterium-Arten war zwar sehr verschieden, nach 75 Std. war aber in Verdünnung 1 : 1000 kein einziges *Closterium* mehr am Leben. Eine Ausnahme bildete *Closterium striolatum,* von dem nach dieser Versuchsdauer nur einzelne Zellen abgestorben waren.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Zwischen den Arten der Gattung *Pleurotaenium* konnte keine nennenswerte Übereinstimmung der Resistenzgrenzen festgestellt werden. Der vitale Grad der Plasmafärbung hält aber bei allen untersuchten Arten länger an, als dies im allgemeinen bei den Closterien der Fall war.

Von *Tetmemorus granulatus* waren in der Verdünnung 1 : 1000 nach 6 Std. bereits zwei Drittel der Zellen tot, ein Drittel schwer geschädigt. Nach 54 Std. hatte sich die Rate der toten Zellen auf fast 80 Prozent erhöht. Nach 76 Std. gab es keine

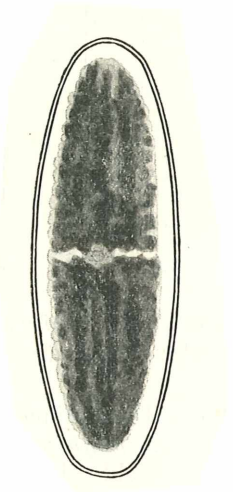


Abb. 2. *Netrium Digitus*, nach sechsstündiger Behandlung mit Malachitgrün 1 : 1000.

Überlebenden mehr. Individuen mit Plasmafärbung zeigten oft noch längere Zeit nach dem Beginn einer deutlichen Plasmafärbung normale Plasmolyse.

Die *Cosmarium*-Arten zeigten sowohl verschiedene Speicherfähigkeit des Plasmas als auch bedeutende Differenzen in der Widerstandskraft. Nach 76 Std. waren jedoch in der Konzentration 1 : 1000 bei allen untersuchten Arten sämtliche Zellen abgestorben. Eine Ausnahme bildete *Cosmarium connatum*, von dem auch nach dieser Zeit noch vereinzelte lebende Individuen zu finden waren. Bei *Cosmarium conspersum* konnte ich einige Zellen beobachten, die weit über 10 Std. intensivster Farbstoffspeicherung zeigten und dabei normal plasmolysierten.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Bei *Euastrum* waren die Ähnlichkeiten zwischen den Arten bezüglich der Widerstandsgrenzen nicht besonders groß. Bemerkenswert für die untersuchten Euastren ist, daß die schon während der vitalen Färbungsphase im Plasma sichtbar gewordenen Kügelchen während der Nekrose noch deutlicher hervortreten und scheinbar etwas an Größe zunehmen. Wenn bei Beginn des Absterbens sich der plasmatische Zellinhalt an einigen Stellen bereits von der Zellwand zurückgezogen hat, sind auch dort im entstandenen Vorraum und direkt am Protoplasten ähnliche kleine dunkelblaue Kügelchen zu sehen.

Micrasterias zeigte bezüglich der Widerstandsgrenzen innerhalb der Arten gewisse Übereinstimmung und leichte Ähnlichkeit mit der Gattung *Penium*.

Auch die Widerstandsgrenzen der *Staurastren* verliefen innerhalb der Arten, die untersucht wurden, ziemlich einheitlich. Nur *Staurastrum scabrum* fiel aus der Reihe, da bei dieser Art nach 54 Std. noch alle Zellen lebten.

Die Chlorophyceen, als ganze Gruppe genommen, besonders was die untersuchten Protococcalen betrifft, waren resistenter als die meisten Konjugaten. Zwischen den Arten und Gattungen der untersuchten Protococcalen konnte große Gleichmäßigkeit bezüglich der Resistenzgrenzen festgestellt werden. Die geprüften Vertreter der Ulothrichales s. lat. (bzw. Confervales s. ant.) waren etwas empfindlicher. Der Nekroseverlauf war dort, wo ein solcher beobachtet werden konnte, dem der Desmidiaceen im großen und ganzen gleich.

Jahreszeitlich bedingte Resistenzunterschiede sowie solche, die die Herkunft von ökologisch oder geographisch verschiedenen Standorten zur Ursache hätten, konnten auch bei diesem Farbstoff nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Zeitlicher Verlauf von Färbung und Nekrose bei *Closterium Lunula*.

Zur Ergänzung der in den vorigen Abschnitten dargelegten Ergebnisse sei noch eine Auswahl von Versuchen gebracht, die unter dauernder mikroskopischer Kontrolle durchgeführt wurden. Die Methodik der Versuche war fast die gleiche wie bei Cholnoky und Höfler 1950 (S. 166). Die mitgeteilten Originalprotokolle sollen für sich sprechen.

Closterium Lunula, eines der größten einheimischen Closterien, eignete sich für diese Untersuchungen am besten. Seine Plastiden

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

sind deutlich rippenwalzenförmig. In ihrem Zentrum erstreckt sich entlang der Längsachse der Zelle ein Vakuolensystem. Die Pyrenoide sind daher mehr peripher angeordnet. Die Außenränder der Plastidenrippen scheinen im dünnen, unbewegten Plasmawandbelag verankert zu sein. Entlang der Membran und um die apikale Seite der beiden Endvakuolen ist eine dauernde und intensive Plasmaströmung zu beobachten. (Die Rotationsströmung ist schon bekannt seit Hofmeister 1867.) Die Endvakuolen selbst, in denen sich Kristalle und Gallertkörperchen in BMB befinden (Höfler 1950), haben keine starre Form. Das Zytoplasma zeigt wabigen Aufbau (ähnlich wie Netrium interruptum und Pleurotaenium Ehrenbergii), der bei ungeschädigten Zellen besonders gut in der Kerngegend zu sehen ist. Auch in den Vakuolen der Plasmawaben sind zahlreiche kleine Körnchen in BMB zu sehen. Diese Vakuolen, die meist von kleinen Plasmaströmchen umkreist werden, füllen auch die Zwischenräume der Plastidenrippen so aus, daß man fast den Eindruck gewinnt, die Plastidenform und der Abstand der Plastidenlamellen würde durch diese „Wabenvakuolen" fixiert.

Im folgenden sei eine kleine Auswahl von Originalprotokollen über die Versuche mit *Closterium Lunula* wiedergegeben.

Erythrosin: p_H 4, Verdünnung 1:5000.

5 Min. nach Versuchsbeginn. Die Plasmaströmung war normal, die Zelle ungefärbt und ohne sichtbare Veränderung. Nach 30 Min. Die Plasmaströmung und die Endvakuolenbewegung blieben normal, der Kern war leicht rosa gefärbt, das Plasma fast farblos, die Pyrenoide leicht rötlich. Nach 45 Min. Das Zytoplasma begann sich leicht hellrosa zu färben, während die Plastiden noch normal grün erschienen. Nach 55 Min. Die Plasmaströmung war nicht mehr überall so deutlich zu sehen wie anfangs. Nach 57 Min. war das Plasma stärker rosa gefärbt, der Inhalt der Endvakuole in normaler BMB. Nach 60 Min. Die Plasmafärbung hatte sich weiter intensiviert, die Plastidenlamellen begannen sich stellenweise vom Plasmawandbelag abzuheben. In der Endvakuole war die BMB nahezu sistiert. Eine deutliche Plasmaströmung konnte nicht mehr festgestellt werden. Nach 63 Min. Die Plasmafärbung war intensiv rosa geworden, die Abhebung der Plastidenlamellen betrug stellenweise bereits 8 bis 10 μ. Die Plastiden selbst waren mit Ausnahme der rötlich tingierten Pyrenoide noch grün. Der Kern hatte sich intensiv hellrot gefärbt. Nach 66 Min. Die Intensivierung der Kern- und Plasmafärbung schritt fort. Nach 68 Min. Die Chloroplasten wurden leicht gelblich, die Rötung der Pyrenoide hatte sich verstärkt, ihr Zentrum erschien dunkelrot. Das Zytoplasma zeigte noch immer Wabenstruktur. Nach 71 Min. Die Kontraktion der Plastidenlamellen verstärkte sich weiter und war eine Minute später soweit fortgeschritten, daß die Abgrenzung der Chloroplastenlamellen undeutlich wurde. Das Plasma zeigte keine deutliche Wabenstruktur mehr, sondern das Bild einer schaumigen Degeneration. Nach 73 Min. war der Zelltod endgültig eingetreten.

Malachitgrün: p_H 10,3, Verdünnung 1:5000.

2 Min. nach Versuchsbeginn. Die sofort einsetzende Plasmafärbung war intensiv und diffus. Die Plastiden hoben sich gleich nach Versuchsbeginn vom Plasmawandbelag an mehreren Stellen ab und kontrahierten sich fortlaufend senkrecht und parallel zur Längsachse. Der Kern war noch nicht deutlich gefärbt. Es ließ sich weder Plasmaströmung noch in den

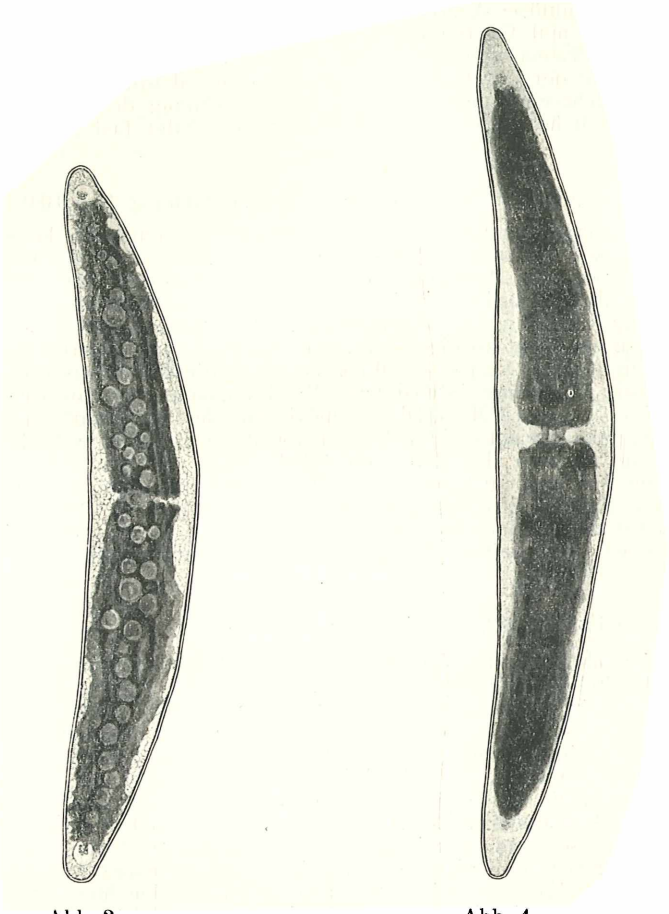


Abb. 3. Abb. 4.

Abb. 3. *Closterium Lunula,* nach 70 Minuten dauernder Vitalfärbung mit Erythrosin 1:5000 bei p_H 4.

Abb. 4. *Closterium Lunula,* nach vier Minuten Färbung mit Malachitgrün konz. 1:5000 bei p_H 10,3.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

bereits deformierten Endvakuolen BMB feststellen. Nach 5 Min. Die erst zarte Membranfärbung wurde dunkler. Durch weitere Plastidenkontraktion wurde die Abgrenzung der Plastidenlamellen immer undeutlicher, Nach 8 Min. Die Plastiden hatten sich dunkelblaugrün gefärbt und das Maximum der Schrumpfung erreicht. Der Kern war intensiv blau, hob sich aber nur undeutlich von der stark tingierten Umgebung ab. — Das Plasma zeigte schon nach 2 Min. keine deutliche Wabenstruktur mehr und bekam zwischen 3 und 4 Min. granulöses Aussehen.—Nach 18 Min. wurde ein Plasmolyseversuch mit 0,4 mol $CaCl_2$ durchgeführt. Die Membran entfärbt sich, das hellblaugrüne Plasma und die schwarzblauen Pyrenoide in den dunkelblauen Klumpen der Chromatophorenmasse wurden deutlich sichtbar. Plasmolyse trat nicht ein, sondern eine Wiederausdehnung der Chloroplasten, deren ursprüngliche Farbe und Lamellenformen wieder fast normal sichtbar wurden.

Malachitgrün: aqua dest., Verdünnung 1:5000.

1 Min. nach Versuchsbeginn. Die Chloroplastenlamellen hoben sich stellenweise bis 5 μ weit vom Wandbelag ab. Die Plasmaströmung war nicht mehr sichtbar und die Bewegung in der Endvakuole sistiert. Die Plastiden hatten noch ihre natürliche Farbe, während sich die Membran zu färben begann. Nach 2 Min. Die Wabenstruktur des Plasmas verschwand, und dieses bekam ein leicht körniges Aussehen. Nach 5 Min. begann sich auch der Kern zu färben. Nach 10 Min. erreichte die Plastidenschrumpfung ihr Maximum. Die weiter intensivierte Membranfärbung erschwerte bereits den Einblick. Nach 17 Min. Die Intensivierung der Membranfärbung hatte ihren Höhepunkt erreicht und machte einen weiteren Einblick in die Nekrosevorgänge im Inneren der Zelle unmöglich. Nach 17 Min. ließ ich eine Lösung von 0.35 mol $CaCl_2$ einwirken. Plasmolyse trat nicht mehr ein. Die Membran entfärbte sich, die Chloroplasten dehnten sich fast zu ihrer normalen Gestalt wieder aus und wurden gelbgrün, die Pyrenoide blieben jedoch intensiv blau gefärbt. Der Kern und der Raum um den Kern zeigte dunkle blaue Färbung.

Vesuvin: p_H 10,3, Verdünnung 1:5000.

3 Min. nach Versuchsbeginn waren die Plasmabewegungen und der Zustand der Zelle völlig unverändert. Nach 6 Min. war noch keine besonders deutliche Färbung sichtbar. Nach 12 Min. Die Plastidenlamellen waren stellenweise bis 8 μ vom Wandbelag abgehoben. Das Vakuom zeigte diffuse helle gelblichbraune Färbung. Nach 35 Min. war die Vakuolenfärbung etwas verstärkt. Nach 45 Min. Die Vakuolenfärbung intensivierte sich weiter, und die Geschwindigkeit der Plasmaströmung nahm merklich ab. Nach 46 Min. Rotbraune dunkle Partikelchen (unter 1 μ Durchmesser) wurden streckenweise, und zwar immer wieder einige μ weit von der Plasmaströmung mitgerissen. Nach 50 Min. Die Plasmaströmung war nur noch partiell sichtbar. Nach 60 Min. Die Partikelchen wurden immer mehr und verdeckten die Endvakuolen fast vollständig. Nur das Vakuom war schwach gefärbt, während im sonst ungefärbten Plasma die erwähnten Partikelchen lagen. Nach 70 Min. war die ganze periphere Plasmaschicht mit solchen Partikelchen erfüllt und keine größere Strecke strömenden Plasmas mehr sichtbar. Nach 75 Min. wurde ein Plasmolyseversuch mit $CaCl_2$ eingeleitet. Es trat Plasmolyse ein, wobei die normalen grünen Plastiden wieder deutlich zum Vorschein kamen. Auch die Deplasmolyse mit sinkenden Konzen-

trationen war gut durchführbar, bei abermaliger Plasmolyse starb die Zelle jedoch ab.

Methylviolett: p_H 10,3, Verdünnung 1:5000.

Nach 2 Min. waren die Plastidenlamellen vom Wandbelag stark abgehoben und die Chloroplastenkontraktion strebte ihrem Maximum zu. Die Plasmaströmung und ebenso die Bewegung in den bereits deformierten Endvakuolen war sistiert. Das Vakuom zeigte diffusviolette Färbung, während das Plasma undeutlich tingiert war. Die einsetzende Membranfärbung machte bereits nach 5 Min. eine weitere Beobachtung der Vorgänge im Zellinnern unmöglich. An Hand mehrerer parallel geführter Plasmolyseversuche konnte der Eintritt des Zelltodes 6 Min. nach Versuchsbeginn festgestellt werden.

Gentianaviolett: p_H 10,3, Verdünnung 1:5000.

2 Min. nach Versuchsbeginn. Die Chloroplastenlamellen hoben sich bereits stark vom Wandbelag ab. Das Vakuom war intensiv diffus violett gefärbt, die Endvakuole etwas heller. Die Plasmafärbung selbst war noch schwach und undeutlich; die Plasmaströmung und die Bewegung in den bereits deformierten Vakuolen der Plasmawaben sowie der ebenfalls deformierten Vakuole hatte aufgehört. Nach 5 Min. begann sich die Membran leicht zu färben. Nach 7 Min. waren auch die letzten Reste einer partiellen Plasmaströmung sistiert. Nach 10 Min. erreichte die Plastidenkontraktion und die ständig stärker gewordene Membranfärbung ihren stärksten Grad. Nach 15 Min. ließ ich hypertonische $CaCl_2$-Lösung einwirken. Der Protoplast kontrahierte sich nur schwach. Normale Plasmolyse trat nicht mehr ein. Es wurde jedoch eine intensive Diffusfärbung des Vakuoms sichtbar.

Weitere Ergebnisse mit verschiedenen Farbstoffen.

Außer den bereits besprochenen Versuchsreihen wurden noch andere, aber kleinere mit verschiedenen basischen und sauren Farbstoffen angestellt. Sie sollen nur abschließend kurz erwähnt werden.

Drawert konnte außer bei den zuvor besprochenen Vitalfarbstoffen unter anderem noch bei folgenden Speicherung im Plasma beobachten: Alizaringelb, Fluoreszein, Pyronin, Rhodamin B, Rhodamin S, Vesuvin, Chrysoidin. — Für Brillantcresylblau, Janusgrün, Methylorange, Nigrosin, Cyanol, Tropaeolin und Säurefuchsin gab er nur Zellsaft- bzw. Zellwandfärbung an. Yahama und Normura erzielten mit Eosin, Erythrosin, Rhodamin B, Orange G, Methylorange, Cyanol extra, Fuchsin S und saurem Anilinblau vitale Plasmafärbung.

Nach meinen eigenen Ergebnissen kommt die Giftwirkung von Alizaringelb der von Erythrosin nahe, wenn auch die Färbung etwas langsamer erfolgt und keine starke Viskositätserhöhung hervorruft. Orange G ist weitaus ungiftiger und zeigte vor 30 bis 40 Std. keine besonders deutliche Plasmafärbung. Aber auch nach ungefähr 40 Std. bewirkte die bereits deutlich sichtbare

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Farbspeicherung im Plasma keine solche Viskositätserhöhung wie Erythrosin. Rhodamin B ermöglichte, wenn zu starke Belichtung vermieden wurde, eine langdauernde, wirklich vitale Plasmafärbung (2—3 Tage und länger).

Rhodamin S ist giftiger als Rhodamin B; nach 2 Tagen begannen schon Zellen verschiedener Arten abzusterben *(Netrium Digitus, Penium minutum, Mesogerron fluitans).* Pyronin, Säurefuchsin, Anilinblau, Cyanol, Nigrosin, Methylorange und Tropäolin 00 brachten nach 2 bis 3 Tagen (in Konz. 1 : 2000) keine Plasmafärbung oder deutliche Vakuolenfärbung hervor, bewirkten aber auch — ausgenommen Tropäolin, das leichte Plastidenverwerfung verursachte — keine sichtbaren Schädigungen. Dasselbe gilt auch von Fluoreszein. Vesuvin wurde im Plasma in Form kleiner körniger Aggregate ausgefällt, und zwar besonders bei *Netrium* und *Closterium Lunula.* Nach 24 Std. waren jedoch noch fast 50% der Zellen von *Netrium Digitus* in Traubenzucker plasmolysierbar, während in einer Chrysoidinlösung von derselben Konzentration (1 : 2000) und bei dem gleichen p_H (aqua dest.) nach längstens 3 Std. alle Zellen tot waren.

Sogar *Scenedesmus* und *Tetraedron minimum* zeigten in Chrysoidin Entmischungserscheinungen im Zellsaft und Plastidendeformation. Bei Janusgrün behinderte die Membranfärbung immer wieder genauere Beobachtungen des Nekroseverlaufs, doch scheint dieser Farbstoff in bezug auf Giftigkeit dem Malachitgrün nahezustehen. Brillantcresylblau färbte die Vakuolen und war ziemlich ungiftig.

Um die untersuchten Farbstoffe nach ihrer Giftigkeit zu reihen, habe ich außerdem Versuchsreihen mit einem anderen Objekt, *Staurastrum botryophillum,* und nochmals mit *Closterium Lunula* angestellt. Sie ergaben folgende Reihung nach absteigender Giftigkeit geordnet. Basische Farbstoffe: Methylviolett, Gentianaviolett, Chrysoidin, Malachitgrün, Brillantgrün, Janusgrün, Methylgrün, Vesuvin, Brillantcresylblau.

Saure Farbstoffe: Erythrosin, Alizaringelb, Eosin, Fluoreszein, Tropäolin 00, Orange G, Nigrosin, Cyanol, Methylorange, Anilinblau.

Die allgemeine Giftigkeit der in den größeren Versuchsreihen geprüften Farbstoffe soll eine kleine Tabelle zeigen. Ein Stoff, der in einer bestimmten Konzentration innerhalb der in den Tabellen angegebenen Versuchsdauer auf irgendeine der untersuchten Arten (*Spirogyra* ausgenommen) tödlich wirkte, ist an der entsprechenden Stelle mit + bezeichnet.

	1:1000	1:2000	1:5000	1:10.000	1:50.000	1:100.000	1:500.000
Erythrosin	+	+	—	1	1	1	1
Eosin	+	+	—	1	1	1	1
Gentianaviolett	+	+	+	+	+	—	1
Malachitgrün .	+	+	+	+	—	1	1
Brillantgrün	+	+	+	+	—	1	1
Methylgrün	+	+	—	1	1	1	1

Zusammenfassung.

Zusammenfassend wäre über die Giftwirkung der geprüften Farbstoffe zu sagen:

1. Artgleiche Zellen, die von ökologisch oder geographisch verschiedenen Standorten stammten, zeigten, soweit festgestellt werden konnte, die gleichen Resistenzeigenschaften und Resistenzgrenzen.
2. Jahreszeitlich bedingte Resistenzdifferenzen konnten nicht gefunden werden, obwohl Versuche mit gleichen Arten zu verschiedenen Jahreszeiten durchgeführt wurden.
3. Wo solche Differenzen doch aufschienen, war auch das Aussehen der Algen vom gesunden sommerlichen Bild durch Speicherungsdegeneration oder andere pathologische Veränderungen deutlich verschieden. Solches „winterliches“ Material wurde in den in der Arbeit besprochenen Resistenzreihen nicht verwendet.
4. Die untersuchten Algen waren gegen verschiedene Farbstoffe verschieden resistent.
5. Ordnet man die Algen nach ihrer Widerstandskraft, so fallen solche Resistenzreihen in manchen Fällen für verschiedene Farbstoffe verschieden aus.
6. Die Stellung der Algen in den Reihen, d. h. die relative Resistenz, war nur bei den sehr empfindlichen Formen *Netrium Digitus*, *Netrium oblongum*, *Cylindrocystis* sowie *Closterium Lunula* und bei den sehr resistenten Algen *Scenedesmus*, *Pediastrum* sowie den meisten Staurastren durchgehend gegen alle Farbstoffe gleich.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

7. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse könnte man die untersuchten Farbstoffe wie folgt nach absteigender Giftigkeit reihen.
   Basische Farbstoffe: Methylviolett, Gentianaviolett, Chrysoidin, Malachitgrün, Brillantgrün, Janusgrün, Methylgrün, Vesuvin, Brillantcresylblau.
   Saure Farbstoffe: Erythrosin, Alizaringelb, Eosin, Fluoreszein, Tropäolin 00, Orange G, Nigrosin, Cyanol, Methylorange, Anilinblau.
8. Resistenzunterschiede, die ein tiefgreifendes Unterscheidungsmerkmal von Konjugaten und Chlorophyceen ergeben hätten, wurden nicht festgestellt.
9. Dagegen ließen sich innerhalb der Zieralgen in weiter Verbreitung Resistenzunterschiede derart nachweisen, daß die *Mesotaeniales (Netrium* und *Cylindrocystis)* gleicher Einwirkung gegenüber viel empfindlicher waren als die *Desmidiales.*
10. Da sich einerseits innerhalb der Versuchsgrenzen keine Resistenzunterschiede zwischen artgleichen Zellen von verschiedenen Standorten ergaben, anderseits sich keine Resistenzgruppen bildeten, die den Artenbestand bestimmter Biocönosen oder Assoziationen umfaßt hätten, ist daraus zu schließen, daß die chemische Resistenz der Algen, soweit sie hier geprüft wurde, „konstitutionell und nicht umweltbezogen" im Sinne Biebls ist.

Es sei gestattet, dem Vorstand des Pflanzenphysiologischen Institutes, meinem verehrten Lehrer Herrn Professor Dr. Karl Höfler, für die Anregung zu dieser Arbeit und seine ständige Hilfe meinen ergebensten Dank abzustatten.

Dem Vorstand der Biologischen Station Lunz, Herrn Professor Dr. Franz Ruttner, schulde ich für die freundliche Überlassung des Arbeitsplatzes sowie für sein liebenswürdiges Entgegenkommen herzlichen Dank.

Literaturverzeichnis.

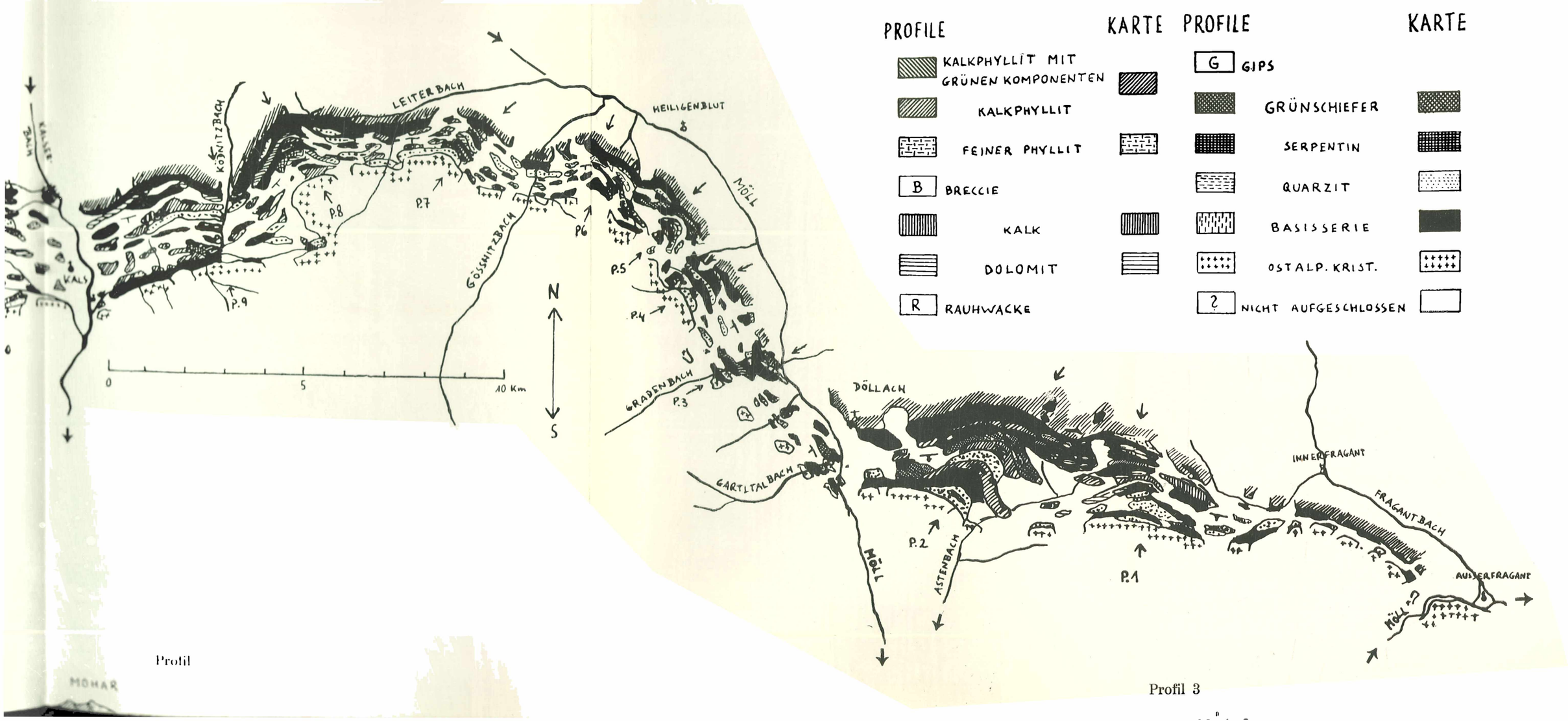
Alberts und Pirson, 1940, Über die Assimilation von Helodeablättern nach Vitalfärbung mit Rhodamin B. Protopl. **35**, 131.
Biebl, R., 1947 Resistenz gegen Zink, Bor und Mangan als Mittel zur Kennzeichnung pflanzlicher Plasmasorten. Sitz.-Ber. österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl., Abt. I. 155.
— 1948, Weitere chemische Resistenzuntersuchungen, Akad. d. Wiss. I. 15.
— 1949, Vergleichende chemische Resistenzstudien, Protopl. **12**, 549.

Brenner, W., 1948, Die Empfindlichkeit und Permeabilität pflanzlicher Protoplasten für Säuren und Basen. Öfv. af. Fin. Vetens. Soc. LX.
Cholnoky, B., 1931, Untersuchungen über den Plasmolyseort der Algenzellen. Protopl. **12**, 510.
— 1937, Protoplasmatische Untersuchungen durch Lebendfärbung und Plasmolyse. Anz. d. ung. Akad. d. Wiss. **159**, 143.
Cholnoky und Höfler, 1950, Vergleichende Vitalfärbungsversuche an Hochmooralgen. Sitz.-Ber. österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl., Abt. I. 159.
Collins, W. A., 1931, Giftresistenz verschieden alter Helodeablätter, Protopl. **12**, 459.
Dangeard, P., 1947, Cytologie végétal et cytologie générale. Paris 1947.
Drawert, H., 1939, Zur Frage der Farbstoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle 1. Vers. mit Rhodaminen. Planta **39**, 376.
— 1940, Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. Flora **34**, 159.
— 1941, Zur Frage der Stoffaufnahme durch die pflanzliche Zelle. Flora **35**, 21.
Eibl, K., 1939, Kontraktion der Chromatophoren bei Micrasterias rotata. Protopl. **32**, 251.
— 1939, Studien über das Plasmolyseverhalten der Desmidiaceenchromatophoren. Protopl. **33**, 532.
Eiselberg, C., 1939: Ionenantagonismus und Giftwirkung an Spirogyra. Biol. Gen. **14**, 21.
Ganzinger, K., 1939: Vergleichende Untersuchungen über die schädigende Wirkung von Hexamethylentetramin auf pflanzliche Zellen. Biol. Gen. **44**, 587.
— 1939, Alkaloidwirkung auf Symphoricarpuszellen. Protopl. **30**, 488.
Gicklhorn, J., 1929, Beobachtungen über vitale Farbstoffspeicherung. Kolloidchem. Beih. **28**, 367.
— 1931: Elektive Vitalfärbung. Ergebn. d. Biol. **7**, 549.
Guilliermond-Atkinson, 1941, The cytoplasm of the plant cell.
Höfler, K., 1932, Vergleichende Protoplasmatik. Ber. d. d. Bot. Ges. **50**, 53.
— 1933, Nekroseformen pflanzlicher Zellen. Ber. d. d. Bot. Ges. **56**, 451.
— 1949, Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. Biol. Gen. **19**, 225.
— 1951, Zur Kälteresistenz einiger Hochmooralgen. Verh. d. Zoo. Bot. **92**, 234.
— 1951, Plasmolyse mit Natriumkarbonat. Protopl. **40**, 426.
Höfler und Schindler, 1951, Vitalfärbung von Algenzellen mit Toluidinblaulösungen gestufter Wasserstoffionenkonzentration. Protopl. **40**, 138.
Hofmeister, L., 1937, Die Wirkung von Äthylenglykol auf die Plastiden von Spirogyra. Protopl. **28**, 48.
— 1948, Vitalfärbungstudien mit Chrysoidin. Sitz.-Ber. österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl., Abt. I. **157**, 55.
Kinzel, H., 1950, Die Algen Spirogyra und Zygnema bei Behandlung mit Kupferoxydammoniak. Mikroskopie **5**, 89.
Kopetzky-Rechtperg. O., 1949, Zellbau und Zelleinschlüsse bei Conjugaten. Protopl. **39**, 106.
Küster, E., 1929, Pathologie der Pflanzenzelle. I. Protoplasmamonogr. **3**.
— 1937, Pathologie der Pflanzenzelle. II. Protoplasmamonogr. **13**.
Kylin, H., 1917, Über die Kälteresistenz der Meeresalgen. Ber. d. d. Bot. Ges. **35**, 370.

Lepeschkin, W., 1937, Zellnekrobiose und Protoplasmatod. Protoplasmamonogr. **12**.
Meindl, J., 1934, Weitere Beiträge zur protoplasmatischen Anatomie des Helodeablattes. Protopl. **30**, 371.
Mender, G., 1938, Protoplasmatische Anatomie des Laubmooses Bryum capillare. Protopl. **30**, 371.
Moder, H., 1932, Beiträge zur protoplasmatischen Anatomie des Helodeablattes. Protopl. **16**, 1.
Pascher, A., Süßwasserflora Deutschlands, alle bisher erschienenen Hefte.
Pecksieder, E., 1950, Zur Frage der Farbionenpermeabilität. Biol. Gen. **19**, 224.
Pfeffer, W., 1886, Über die Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. Unters. Bot. Inst. Tüb. 1886.
Rabenhorst, L., Kryptogamenflora, alle bisher erschienenen Bände (insbes. Desmidiaceen, Zygnemales, Oedogoniales, Heterocontae, Diatomeen, Cyanophyceen).
Reuter, L., 1941, Über die Salzresistenz der Epidermiszellen des Blattes von Pisum sativum. Protopl. **35**, 330.
Schaede, R., 1923, Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarbstoffen. Jahrb. f. wiss. Bot. **62**, 65.
Schindler, H., 1938, Tötungsart und Absterbebild. Protopl. 30, 186.
— 1938, Tötungsart und Absterbebild II. Protopl. **30**, 547.
Strugger, S., 1931, Zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Erythrosin. Ber d. d. Bot. Ges. **49**, 435.
— 1936, Die Vitalfärbung der Chloroplasten von Helodea mit Rhodaminen. Flora **135**, 131.
— 1941, Zellphysiologische Studien mit Fluoreszenzindikatoren. Flora **35**, 101.
— 1949, Praktikum der Zell- und Gewebsphysiologie der Pflanze. 2. Aufl.
Weber, F., 1929, Protoplasmatische Pflanzenanatomie. Protopl. **8**, 291.
— 1931, Protoplasmatische Ungleichheit morphologisch gleicher Zellen. Protopl. **14**, 75.
— 1932, Unterschiede in der Säureresistenz der Helodeablattzellen. Protopl. **16**, 287.
— 1933, Alkoholrestistenz ungleich alter Spirogyrazellen. Protopl. **20**, 15.
West, E. G., 1905, Monographie of the British Desmidiaceae Vol. I.—V.
Wulff, H., 1934, Lebendfärbung mit Chrysoidin. Planta **22**, 70.
Yahama und Nomura, 1939, Über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration und der Neutralsalze auf die Vitalfärbung pflanzlicher Protoplasten. Science. Rep. Tokio. B. D. **1939**.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at



Profil

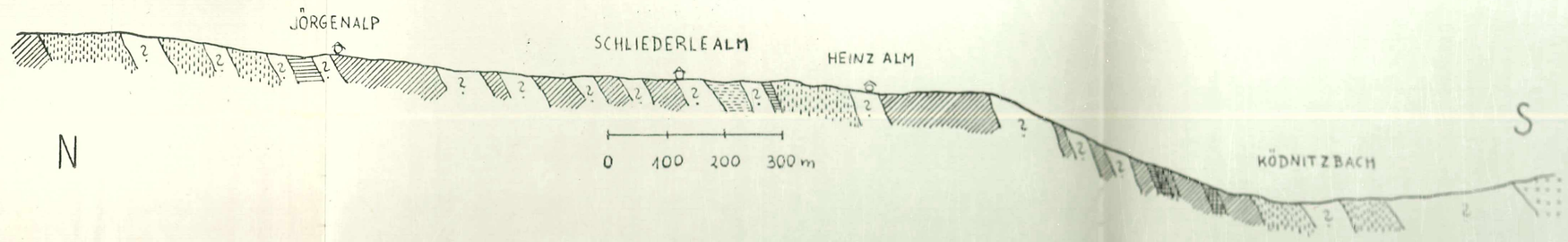
Profil 3

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

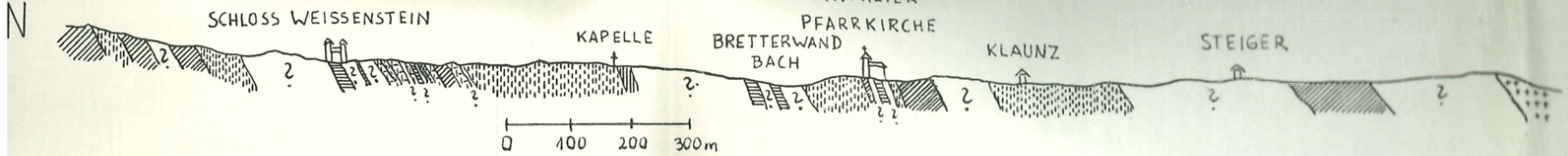
©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

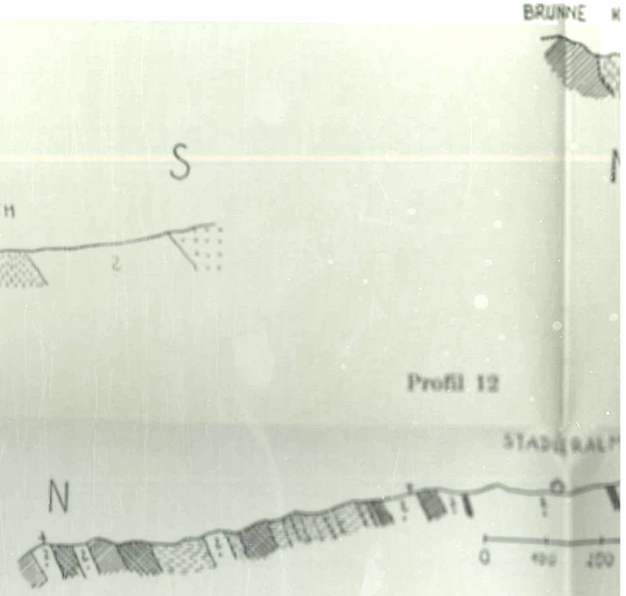
Profil 9



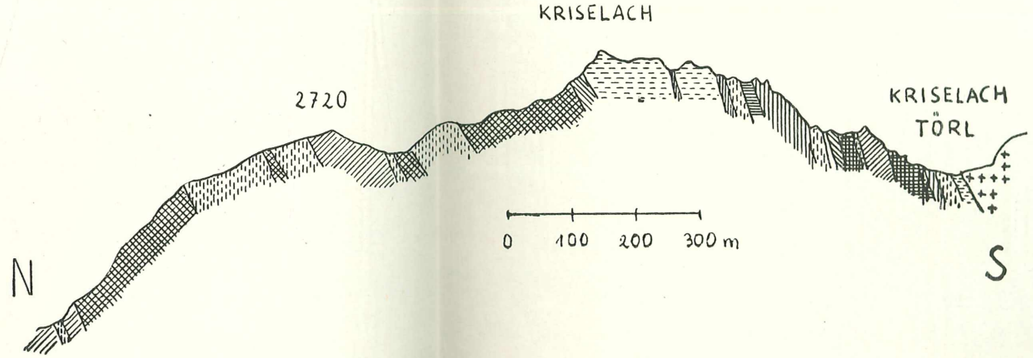
Profil 11



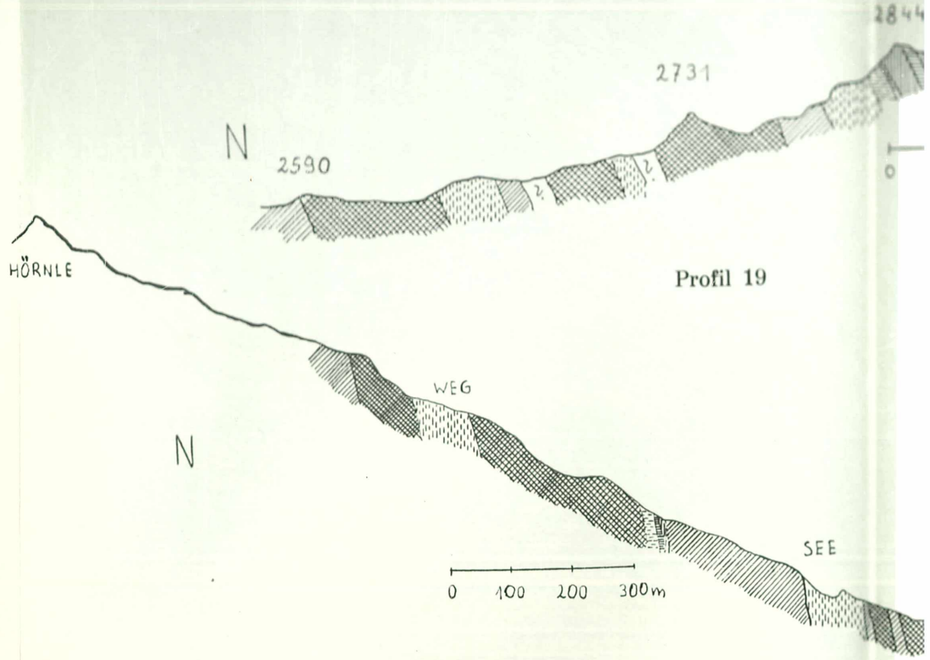
Profil 12



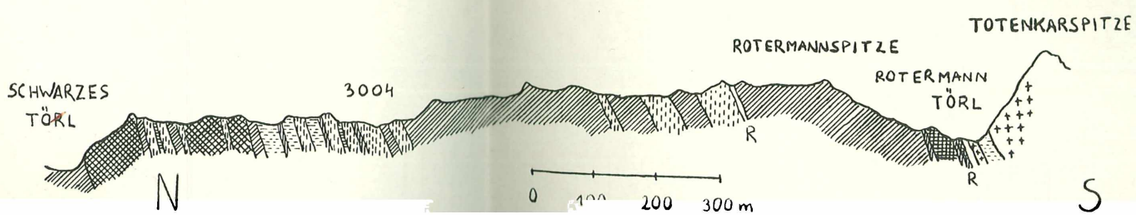
Profil 15



Profil 16

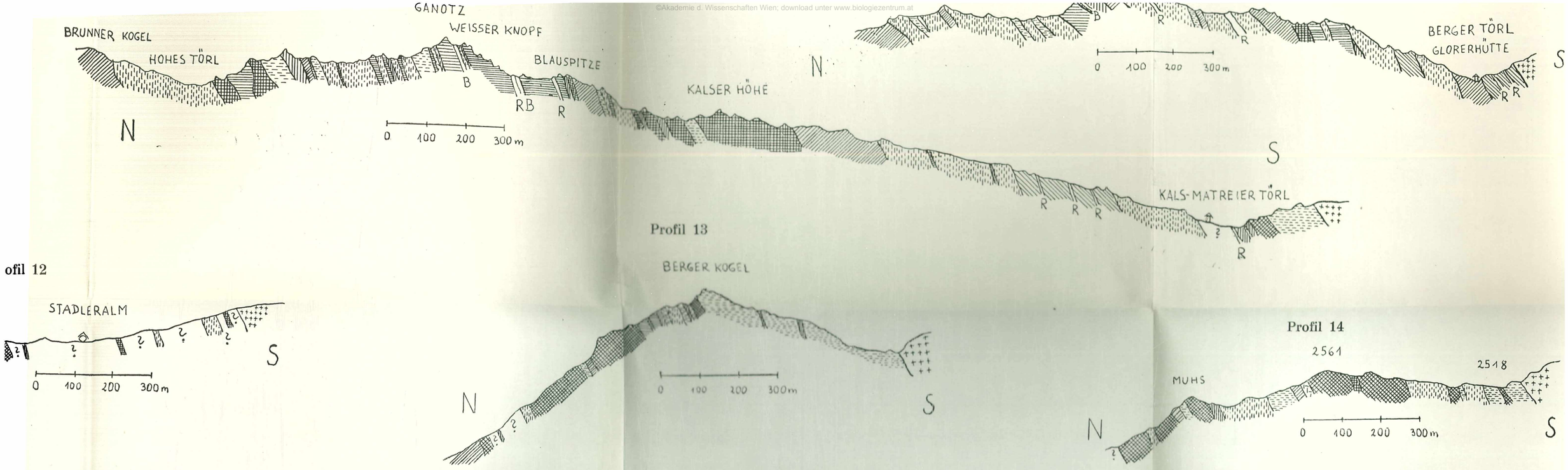


Profil 18



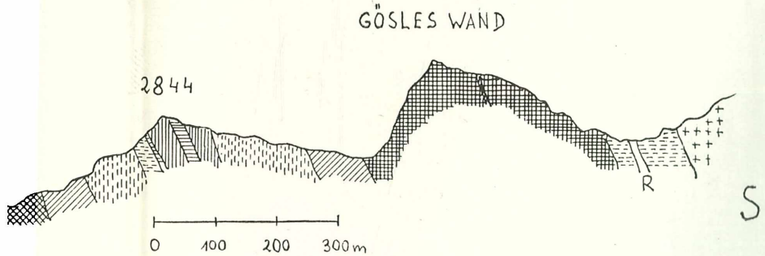
Profil 19

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

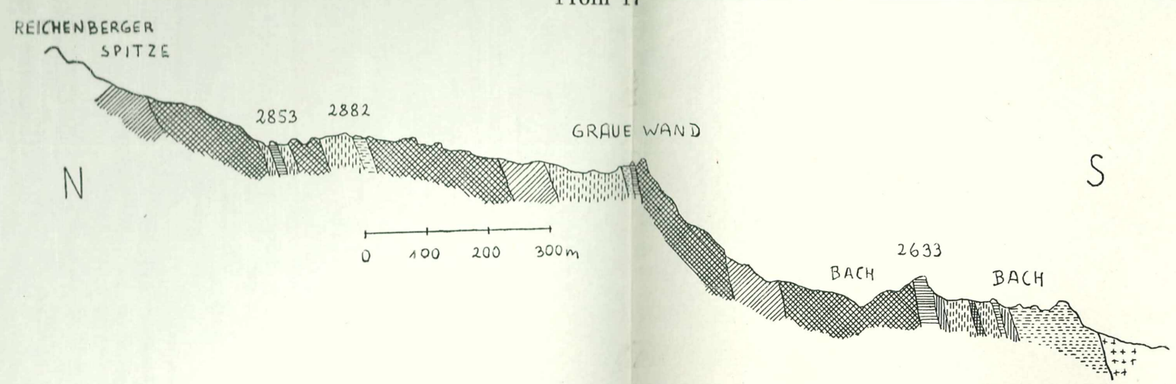


ofil 12

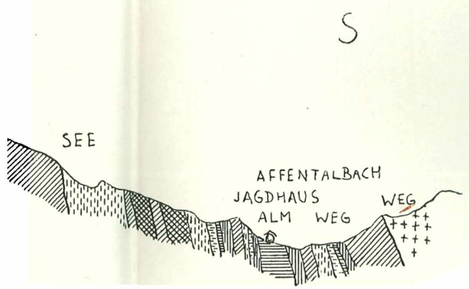
Profil 16



Profil 17



19



Profil 20